

PCT/ES 2004/070053



MINISTERIO
DE INDUSTRIA, TURISMO
Y COMERCIO



Oficina Española
de Patentes y Marcas

REC'D 05 OCT 2004

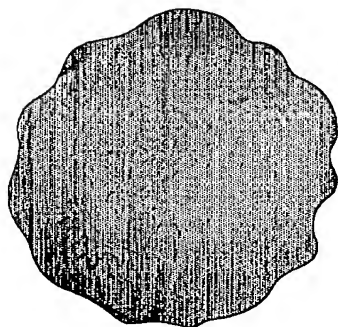
WIPO

PCT

CERTIFICADO OFICIAL

Por la presente certifico que los documentos adjuntos son copia exacta de la solicitud de PATENTE de INVENCION número 200301830 , que tiene fecha de presentación en este Organismo el 31 de Julio de 2003.

Madrid, 24 de Septiembre de 2004



El Director del Departamento de Patentes
e Información Tecnológica.

P.D.

Mª DEL MAR BIARGE MARTÍNEZ

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)



MINISTERIO
DE CIENCIA
Y TECNOLOGÍA



Oficina Española
de Patentes y Marcas

INSTANCIA DE SOLICITUD

NUMERO DE SOLICITUD

P200301830

03 JUL 31 11:25

FECHA Y HORA DE PRESENTACIÓN EN LA O.E.P.M.

FECHA Y HORA PRESENTACIÓN EN LUGAR DISTINTO O.E.P.M.

(4) LUGAR DE PRESENTACIÓN:

CÓDIGO

MADRID

28

(1) MODALIDAD:

☒ PATENTE DE INVENCION

☐ MODELO DE UTILIDAD

(2) TIPO DE SOLICITUD:

☐ ADICIÓN A LA PATENTE

☐ SOLICITUD DIVISIONAL

☐ CAMBIO DE MODALIDAD

☐ TRANSFORMACIÓN SOLICITUD PATENTE EUROPEA

☐ PCT: ENTRADA FASE NACIONAL

(3) EXP. PRINCIPAL O DE ORIGEN:

MODALIDAD

Nº SOLICITUD

FECHA SOLICITUD

(5) SOLICITANTE (S): APELLIDOS O DENOMINACIÓN SOCIAL

CONSEJO SUP. INVESTIG. CIENTÍFICAS

NOMBRE

NACIONALIDAD

ESPAÑOLA

CÓDIGO PAÍS

ES

DNI/CIF

Q2818002D

CNAE

PYME

(6) DATOS DEL PRIMER SOLICITANTE:

DOMICILIO SERRANO, 117

LOCALIDAD MADRID

PROVINCIA MADRID

PAÍS RESIDENCIA ESPAÑA

NACIONALIDAD ESPAÑOLA

TELÉFONO 91 5855000

FAX 91 5855287

CORREO ELECTRÓNICO ott@csic.es

CÓDIGO POSTAL 28006

CÓDIGO PAÍS ES

CÓDIGO PAÍS ES

(7) INVENTOR (ES):

APELLIDOS

LORENZO PRIETO
FERNÁNDEZ HERRERO

NOMBRE

VICTOR DE
LUIS ÁNGEL

NACIONALIDAD

ESPAÑOLA
ESPAÑOLA

CÓDIGO

PAÍS
ES
ES

(8) ☐ EL SOLICITANTE ES EL INVENTOR

☒ EL SOLICITANTE NO ES EL INVENTOR O ÚNICO INVENTOR

(9) MODO DE OBTENCIÓN DEL DERECHO:

☒ INVEN. LABORAL

☐ CONTRATO

☐ SUCESIÓN

(10) TÍTULO DE LA INVENCION:

SISTEMA PARA LA PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS DIMÉRICAS BASADO EN EL SISTEMA DE TRANSPORTE DE HEMOLISINA DE Escherichia coli

(11) EFECTUADO DEPÓSITO DE MATERIA BIOLÓGICA:

☐ SI

☒ NO

(12) EXPOSICIONES OFICIALES: LUGAR

FECHA

(13) DECLARACIONES DE PRIORIDAD:

PAÍS DE ORIGEN

CÓDIGO
PAÍS

NÚMERO

FECHA

(14) EL SOLICITANTE SE ACOGE AL APLAZAMIENTO DE PAGO DE TASAS PREVISTO EN EL ART. 162. LEY 11/86 DE PATENTES

☐

(15) AGENTE /REPRESENTANTE: NOMBRE Y DIRECCIÓN POSTAL COMPLETA. (SI AGENTE P.I., NOMBRE Y CÓDIGO) (RELLÉNESE, ÚNICAMENTE POR PROFESIONALES)

(16) RELACIÓN DE DOCUMENTOS QUE SE ACOMPAÑAN:

☒ DESCRIPCIÓN Nº DE PÁGINAS: 30

☒ Nº DE REIVINDICACIONES: 8

☒ DIBUJOS. Nº DE PÁGINAS: 30

☒ LISTA DE SECUENCIAS Nº DE PÁGINAS: 3

☒ RESUMEN

☐ DOCUMENTO DE PRIORIDAD

☐ TRADUCCIÓN DEL DOCUMENTO DE PRIORIDAD

☐ DOCUMENTO DE REPRESENTACIÓN

☒ JUSTIFICANTE DEL PAGO DE TASA DE SOLICITUD

☐ HOJA DE INFORMACIÓN COMPLEMENTARIA

☐ PRUEBAS DE LOS DIBUJOS

☐ CUESTIONARIO DE PROSPECCIÓN

☒ OTROS: AUTORIZACIÓN

FIRMA DEL SOLICITANTE O REPRESENTANTE

Osmingo R...
(VER COMUNICACIÓN)

FIRMA DEL FUNCIONARIO

a

NOTIFICACIÓN SOBRE LA TASA DE CONCESIÓN:

Se le notifica que esta solicitud se considerará retirada si no procede al pago de la tasa de concesión; para el pago de esta tasa dispone de tres meses a contar desde la publicación del anuncio de la concesión en el BOPI, más los diez días que establece el art. 81 del R.D. 2245/1986.

ILMO. SR. DIRECTOR DE LA OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

informacion@oepm.es

www.oepm.es

C/ PANAMÁ, 1 - 28071 MADRID

MOD. 31(01) - 1 - EJEMPLAR PARA EL EXPEDIENTE

NO CUMPLIMENTAR LOS RECUADROS ENMARCADOS EN ROJO



MINISTERIO
DE CIENCIA
Y TECNOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA



Oficina Española
de Patentes y Marcas

NÚMERO DE SOLICITUD

P200301830

FECHA DE PRESENTACIÓN

RESUMEN Y GRÁFICO

RESUMEN (Máx. 150 palabras)

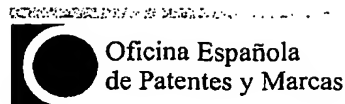
SISTEMA PARA LA PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS DIMÉRICAS BASADO EN EL SISTEMA DE TRANSPORTE DE HEMOLISINA DE *Escherichia coli*

El sistema comprende una construcción de ADN que comprende: a) una primera secuencia de ácido nucleico que contiene la secuencia de nucleótidos que codifica para un producto de interés; b) una segunda secuencia de ácido nucleico que contiene la secuencia de nucleótidos que codifica para un dominio de dimerización; y c) una tercera secuencia de ácido nucleico que contiene la secuencia de nucleótidos que codifica para la -hemolisina (HlyA) de *Escherichia coli* o para un fragmento de dicha proteína que comprende la señal de reconocimiento del mecanismo de secreción del sistema transportador de hemolisina (Hly) de *E. coli*; en donde el extremo 3' de dicha primera secuencia de ácido nucleico está unido al extremo 5' de dicha segunda secuencia de ácido nucleico y el extremo 3' de dicha segunda secuencia de ácido nucleico está unido al extremo 5' de dicha tercera secuencia de ácido nucleico. De aplicación en la producción de proteínas recombinantes diméricas.

GRÁFICO



MINISTERIO
DE CIENCIA
Y TECNOLOGÍA



Oficina Española
de Patentes y Marcas

12

SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION

P2 21 NÚMERO DE SOLICITUD
00301830

31 NÚMERO		DATOS DE PRIORIDAD		33 PAÍS		22 FECHA DE PRESENTACIÓN
32 FECHA						62 PATENTE DE LA QUE ES DIVISORIA
71 SOLICITANTE (S) CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS DOMICILIO SERRANO, 117 - 28006 MADRID NACIONALIDAD ESPAÑOLA						
72 INVENTOR (ES) VICTOR DE LORENZO PRIETO Y LUIS ANGEL FERNÁNDEZ HERRERO						
51 Int. Cl.				GRÁFICO (SÓLO PARA INTERPRETAR RESUMEN)		
54 TÍTULO DE LA INVENCION SISTEMA PARA LA PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS DIMÉRICAS BASADO EN EL SISTEMA DE TRANSPORTE DE HEMOLISINA DE Escherichia coli						
57 RESUMEN SISTEMA PARA LA PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS DIMÉRICAS BASADO EN EL SISTEMA DE TRANSPORTE DE HEMOLISINA DE Escherichia coli El sistema comprende una construcción de ADN que comprende: a) una primera secuencia de ácido nucleico que contiene la secuencia de nucleótidos que codifica para un producto de interés; b) una segunda secuencia de ácido nucleico que contiene la secuencia de nucleótidos que codifica para un dominio de dimerización; y c) una tercera secuencia de ácido nucleico que contiene la secuencia de nucleótidos que codifica para la -hemolisina (HlyA) de Escherichia coli o para un fragmento de dicha proteína que comprende la señal de reconocimiento del mecanismo de secreción del sistema transportador de hemolisina (Hly) de E. coli; en donde el extremo 3' de dicha primera secuencia de ácido nucleico está unido al extremo 5' de dicha segunda secuencia de ácido nucleico y el extremo 3' de dicha segunda secuencia de ácido nucleico está unido al extremo 5' de dicha tercera secuencia de ácido nucleico. De aplicación en la producción de proteínas recombinantes diméricas.						

TÍTULO

SISTEMA PARA LA PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS DIMÉRICAS BASADO EN EL SISTEMA DE TRANSPORTE DE HEMOLISINA DE *Escherichia coli*

5 CAMPO DE LA INVENCION

Esta invención se relaciona con la producción de proteínas recombinantes diméricas mediante el empleo de un sistema de expresión de proteínas basado en el sistema de transporte de hemolisina de *Escherichia coli*.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Desde hace algún tiempo se está investigando en la producción de proteínas de fusión que comprenden fragmentos de anticuerpos recombinantes bi- o multifuncionales (minianticuerpos). Estas proteínas de fusión presentan algunas ventajas y pueden ser utilizadas con fines terapéuticos o de diagnóstico. Por este motivo, se han ido
15 desarrollando diversos sistemas de expresión de fragmentos de anticuerpos. Algunos de estos sistemas de expresión se basan en el empleo de *Escherichia coli*.

Habitualmente se seleccionan diferentes fragmentos de anticuerpos y se producen en *E. coli* tras la clonación de fragmentos de las regiones variable (V) y constante (C) de inmunoglobulinas (Ig) en vectores de fagos filamentosos o fagomidios
20 [Hoogenboom, H. R. 1997. Designing and optimizing library selection strategies for generating high-affinity antibodies Trends in Biotechnology. 15:62-70; Hoogenboom, H. R. 2002. Overview of antibody phage-display technology and its applications Methods Mol Biol. 178:1-37; Winter, G., A. D. Griffiths, R. E. Hawkins, and H. R. Hoogenboom 1994. Making antibodies by phage display technology Annual Rev. Immunol. 12:433-455]. Estos fragmentos reconstruyen el sitio de unión al antígeno del anticuerpo original que, en general, se ensambla mediante el contacto de los dominios V de las cadenas pesadas (H) y ligeras (L) [Ay, J., T. Keitel, G. Kuttner, H. Wessner, C. Scholz, M. Hahn, and W. Hohne 2000. Crystal structure of a phage library-derived single-chain Fv fragment complexed with turkey egg-white lysozyme at 2.0 Å resolution J Mol Biol. 301:239-46]. Este es el caso de las moléculas Fab, que consisten
25 en la asociación de dos polipéptidos que contienen los dominios V_H-C_{H1} y V_L-C_L y de las moléculas Fv (scFv) de cadena simple, en las que los dominios V_H y V_L se unen en un único polipéptido. Las moléculas de Fab y scFv tienen ventajas importantes, tales
30

como niveles de expresión más elevados en *E. coli* y una mejor distribución y aclaramiento más rápido cuando se administran *in vivo* para aplicaciones diagnósticas o terapéuticas [Carter, P., and A. M. Merchant 1997. Engineering antibodies for imaging and therapy *Current Opinion in Biotechnology*. 8:449-454; Marasco, W. A., and S. Dana Jones 1998. Antibodies for targeted gene therapy: extracellular gene targeting and intracellular expression *Adv Drug Deliv Rev*. 31:153-170; Yokota, T., D. E. Milenic, M. Whitlow, and J. Schlom 1992. Rapid tumor penetration of a single-chain Fv and comparison with other immunoglobulin forms *Cancer Res*. 52:3402-8].

- También se han producido en *E. coli* fragmentos de anticuerpo basados en un único dominio de Ig [Nuttall, S. D., R. A. Irving, and P. J. Hudson 2000. Immunoglobulin VH domains and beyond: design and selection of single-domain binding and targeting reagents *Curr Pharm Biotechnol*. 1:253-63; Riechmann, L., and S. Muyldermans 1999. Single domain antibodies: comparison of camel VH and camelised human VH domains *J Immunol Methods*. 231:25-38; Sheriff, S., and K. L. Constantine 1996. Redefining the minimal antigen-binding fragment *Nat Struct Biol*. 3:733-6]. Este progreso se realizó gracias al hallazgo de que en las especies de camélidos (por ejemplo, llamas, camellos) una proporción de sus anticuerpos naturales carece de cadena-ligera, construyendo por tanto sus superficie de unión a antígenos con un único dominio V de la cadena pesada (V_{HH}). Además de los beneficios de scFv y Fabs, los dominios V_{HH} han demostrado una estabilidad y solubilidad superiores y una inmunogenicidad inferior [Cortez-Retamozo, V., M. Lauwereys, G. Hassanzadeh Gh, M. Gobert, K. Conrath, S. Muyldermans, P. De Baetselier, and H. Revets 2002. Efficient tumor targeting by single-domain antibody fragments of camels *Int J Cancer*. 98:456-62; Nuttall, S. D., R. A. Irving, and P. J. Hudson 2000. Immunoglobulin VH domains and beyond: design and selection of single-domain binding and targeting reagents *Curr Pharm Biotechnol*. 1:253-63; Riechmann, L., and S. Muyldermans 1999. Single domain antibodies: comparison of camel VH and camelised human VH domains *J Immunol Methods*. 231:25-38]. Sin embargo, todos estos fragmentos de anticuerpo pierden la bivalencia de unión a antígenos (o multivalencia) mostrada por los anticuerpos completos. Su carácter monovalente se refleja por una disminución en la afinidad funcional (avidez) para sus antígenos correspondientes. Para solventar este problema, se obtuvieron por ingeniería genética cortos dominios de oligomerización (por ejemplo, hélices anfipáticas) en los extremos C

- terminales para producir minianticuerpos bivalentes y tetravalentes con avidéz idéntica a los anticuerpos completos [Pack, P., M. Kujau, V. Schroeckh, U. Knupfer, R. Wenderoth, D. Riesenbergh, and A. Plückthun 1993. Improved bivalent miniantibodies, with identical avidity as whole antibodies, produced by high cell density fermentation of *Escherichia coli* Biotechnology (N Y). 11:1271-7; Pack, P., K. Muller, R. Zahn, and A. Plückthun 1995. Tetravalent miniantibodies with high avidity assembling in *Escherichia coli* J Mol Biol. 246:28-34; Pack, P., and A. Plückthun 1992. Miniantibodies: use of amphipathic helices to produce functional, flexibly linked dimeric FV fragments with high avidity in *Escherichia coli* Biochemistry. 31:1579-84;
- 10 Plückthun, A., and P. Pack 1997. New protein engineering approaches to multivalent and bispecific antibody fragments Immunotechnology. 3:83-105; Rheinneck, M., C. Hardt, L. L. Ilag, P. Kufer, R. Gruber, A. Hoess, A. Lupas, C. Rottenberger, A. Plückthun, and P. Pack 1996. Multivalent antibody fragments with high functional affinity for a tumor-associated carbohydrate antigen J Immunol. 157:2989-97].
- 15 En casi todos los casos, los fragmentos de anticuerpos monovalentes y multivalentes se han producido en el espacio periplásmico de *E. coli* fusionándoles un péptido señal en el extremo N terminal (N-SP) que es reconocido por la maquinaria celular de la ruta de secreción general (Sec) [Plückthun, A., C. Krebber, U. Krebber, U. Horn, U. Knüpfer, R. Wenderoth, L. Nieba, K. Proba, and D. Riesenbergh 1996.
- 20 Producing antibodies in *Escherichia coli*: from PCR to fermentation, p. 203-252. In J. McCafferty, and H. R. Hoogenboom (eds), Antibody Engineering: A Practical Approach. IRL Press, Oxford]. Recientemente se ha descrito un método alternativo para la producción de scFvs funcionales en el medio extracelular de cultivos de *E. coli* que emplean el transportador de la hemolisina α (Hly) [Fernández, L. A., I. Sola, L.
- 25 Enjuanes, and V. de Lorenzo 2000. Specific secretion of active single-chain Fv antibodies into the supernatants of *Escherichia coli* cultures by use of the hemolysin system Appl Environ Microbiol. 66:5024-5029]. Este sistema de secreción es independiente de los genes *sec* celulares y consta de dos componentes de membrana interna (IM), HlyB y HlyD, y el poro de la membrana externa (OM), TolC, que se
- 30 ensamblan en un gran complejo proteico con un canal hidrófilo interno [Gentschev, I., G. Dietrich, and W. Goebel 2002. The *E. coli* alpha-hemolysin secretion system and its use in vaccine development Trends Microbiol. 10:39-45; Koronakis, V., C. Andersen, and C. Hughes 2001. Channel-tunnels Curr Opin Struct Biol. 11:403-7;

- Koronakis, V., A. Sharff, E. Koronakis, B. Luisi, and C. Hughes 2000. Crystal structure of the bacterial membrane protein TolC central to multidrug efflux and protein export *Nature*. 405:914-919; Thanabalu, T., E. Koronakis, C. Hughes, and V. Koronakis 1998. Substrate-induced assembly of a contiguous channel for protein export from *E. coli*: reversible bridging of an inner-membrane translocase to an outer membrane exit pore *EMBO J.* 17:6487-96]. El sustrato natural de este sistema, la toxina de la hemolisina α (HlyA), se expulsa a través de este canal directamente desde el citoplasma hacia el medio extracelular sin un intermediario periplásmico y de una forma dependiente de ATP. La señal reconocida por la maquinaria de secreción de Hly se localiza en el extremo C terminal de HlyA. Se ha demostrado que los híbridos scFv-HlyA, que contienen una molécula de scFv que carece del N-SP unido al último HlyA de aproximadamente 23 kDa, se secretan de una forma funcional y oxidada por el transportador de Hly [Fernández, L. A., and V. De Lorenzo 2001. Formation of disulphide bonds during secretion of proteins through the periplasmic-independent type I pathway *Mol Microbiol.* 40:332-46; Fernández, L. A., I. Sola, L. Enjuanes, and V. de Lorenzo 2000. Specific secretion of active single-chain Fv antibodies into the supernatants of *Escherichia coli* cultures by use of the hemolysin system *Appl Environ Microbiol.* 66:5024-5029].

- Por otra parte, la dimerización es una propiedad que con frecuencia se desea conseguir por ingeniería genética en las proteínas cuando está implicada una actividad de unión (por ejemplo, en las interacciones proteína-ADN o antígeno-anticuerpo), puesto que puede intensificar su afinidad funcional (avidez) [Baxevanis, A. D., and C. R. Vinson 1993. Interactions of coiled coils in transcription factors: where is the specificity? *Curr Opin Genet Dev.* 3:278-85; Busch, S. J., and P. Sassone-Corsi 1990. Dimers, leucine zippers and DNA-binding domains *Trends Genet.* 6:36-40; Crothers, D. M., and H. Metzger 1972. The influence of polyvalency on the binding properties of antibodies *Immunochemistry.* 9:341-357; Plückthun, A., and P. Pack 1997. New protein engineering approaches to multivalent and bispecific antibody fragments *Immunotechnology.* 3:83-105]. Un procedimiento para la producción de proteínas diméricas que comprenden dos proteínas de fusión monoméricas en una interacción no covalente ha sido descrito en la patente norteamericana US 5.910.573. Las proteínas diméricas así obtenidas se acumulan dentro de la célula en el espacio periplásmico, sin secretarse al medio extracelular. Esto conduce a una mayor toxicidad de su expresión

para la bacteria *E. coli*, induciendo un menor rendimiento en los cultivos (peso seco de células por litro), y dificultando la posterior purificación del anticuerpo dimérico al tener que lisar (romper) las bacterias.

Por tanto, sigue existiendo la necesidad de desarrollar sistemas alternativos para la producción de proteínas diméricas.

COMPENDIO DE LA INVENCION

La invención proporciona una solución a la necesidad existente basada en el desarrollo de una construcción de ADN que comprende (i) una secuencia de nucleótidos que codifica para la α -hemolisina (HlyA) de *Escherichia coli* o para un fragmento de dicha proteína que comprende la señal de reconocimiento del mecanismo de secreción del sistema transportador de hemolisina (Hly) de *E. coli*; (ii) una secuencia de nucleótidos que codifica para un dominio de dimerización; y (iii) una secuencia de nucleótidos que codifica para un producto de interés. Mediante el empleo de dicho sistema de expresión y secreción de proteínas se obtienen proteínas diméricas en el medio. La eficacia de dicho sistema de secreción ha sido demostrada mediante la producción de minianticuerpos de alta avidez derivados de los anticuerpos de camello V_{HH} (Ejemplo 1).

El translocador de hemolisina de *E. coli* se había usado anteriormente para la secreción de polipéptidos heterólogos, especialmente toxinas y antígenos de patógenos, así como para la secreción de anticuerpos recombinantes scFv. Sin embargo, los resultados ahora obtenidos han puesto de manifiesto que la incorporación de una hélice anfipática de autodimerización en el extremo N terminal de C-HlyA no interfiere con la secreción de Hly y permite la dimerización del polipéptido secretado. Asimismo, la dimerización intensifica la avidez de la unión del polipéptido secretado derivado de C-HlyA. Además, también puede tener otras aplicaciones, como la asociación molecular de varios antígenos y/o adyuvantes producidos por cepas bacterianas vivas, o la combinación de diversas actividades biológicas para la generación de moléculas biespecíficas (por ejemplo, la unión a un antígeno y el reclutamiento del complemento).

Por tanto, un aspecto de esta invención se relaciona con una construcción de ADN que comprende (i) una secuencia de nucleótidos que codifica para la α -hemolisina (HlyA) de *Escherichia coli* o para un fragmento de dicha proteína que comprende la señal de reconocimiento del mecanismo de secreción del sistema transportador de

hemolisina (Hly) de *E. coli*; (ii) una secuencia de nucleótidos que codifica para un dominio de dimerización; y (iii) una secuencia de nucleótidos que codifica para un producto de interés.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un cassette de expresión que comprende dicha construcción de ADN operativamente unida a una secuencia de control de expresión de la secuencia de nucleótidos que codifica para el producto de interés.

En otro aspecto, la invención se relaciona con una bacteria que comprende dicha construcción de ADN o dicho cassette de expresión.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para producir un producto de interés, en forma de una proteína de fusión dimérica, que comprende crecer dicha bacteria bajo condiciones que permiten la producción y excreción al medio de cultivo de dicho producto de interés en forma de una proteína de fusión dimérica.

En otro aspecto, la invención se relaciona con una proteína de fusión dimérica obtenible por expresión de la secuencia de ácido nucleico contenida dicha construcción de ADN.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1 ilustra la secreción del polipéptido C-HlyA que contiene el dominio ZIP. La Figura 1A muestra una representación esquemática de la estructura de los polipéptidos EHlyA y ZEHlyA que contienen la señal de secreción de 23 kDa (*hlyA*) del transportador de Hly de *E. coli* marcado con el epítipo E. La masa de dichos polipéptidos (en kDa), deducida de su secuencia de aminoácidos, se muestra a la derecha. Se indica la composición del dominio ZIP (bisagra de Ig, cremallera de leucina, marca de 6xhis). También se muestra la secuencia de aminoácidos de la región N terminal de ambos polipéptidos EHlyA y ZEHlyA. La Figura 1B es una representación esquemática del polipéptido C-HlyA (monomérico) marcado con el epítipo E y del polipéptido C-HlyA (dimérico) marcado con el epítipo E y que contiene el dominio ZIP (bisagra de Ig, cremallera de leucina, marca de 6xhis). La Figura 1C muestra el resultado de la inmuno-transferencia desarrollada con un anticuerpo monoclonal anti-E marcado con POD de las proteínas secretadas (S) y celulares (C) producidas tras la inducción de 4 h con IPTG 0,3 mM de cultivos de células de *E. coli* HB2151, crecidas a 37°C, que contienen el plásmido pVDL9.3 (que codifica para HlyB

y HlyD) y uno de los plásmidos indicados, pEHlyA o pZEHlyA. Las proteínas cargadas por carril representan las encontradas en aproximadamente 5 µl de los sobrenadantes (S) del cultivo y las de las células de *E. coli* (C) presentes en aproximadamente 100 µl de los mismos cultivos (DO_{600nm} aproximadamente 2).

La Figura 2 ilustra el entrecruzamiento de los polipéptidos C-HlyA secretados con glutarato de disuccinimidilo (DSG). Los polipéptidos EHlyA y ZEHlyA secretados (10 µg/ml en PBS aproximadamente) se incubaron con DSG, a las concentraciones indicadas, y se sometieron a SDS-PAGE desnaturalizante y a inmunotransferencia con anticuerpo monoclonal anti-E marcado con POD (véase el Ejemplo 1, apartado relativo a los Materiales y Métodos, para más detalles). Tal como se muestra, ZEHlyA se entrecruzó con DSG formando una banda proteica en SDS-PAGE de aproximadamente 66 kDa, unas dos veces el tamaño de su monómero.

La Figura 3 muestra los resultados de la cromatografía de filtración en gel de los polipéptidos de C-HlyA monoméricos y diméricos. La Figura 3A es un gráfico que representa el volumen de elución de los polipéptidos EHlyA (círculo) y ZEHlyA (triángulo) separados por cromatografía de filtración en gel (véase el Ejemplo 1, apartado relativo a los Materiales y Métodos, para más detalles) junto con patrones de proteínas de masa conocida (cuadrados). Los patrones de masa utilizados fueron la tiroglobulina (Mr 670.000), la gammaglobulina bovina (Mr 158.000), la ovoalbúmina de pollo (Mr 44.000) y la mioglobina equina (Mr 17.000). La presencia de EHlyA o ZEHlyA en las fracciones eluidas se determinó por inmunotransferencia con anticuerpo monoclonal anti-E marcado con POD. La Figura 3B muestra el resultado de la inmunotransferencia desarrollada con un anticuerpo monoclonal anti-E marcado con POD de los polipéptidos EHlyA y ZEHlyA. Una representación esquemática de EHlyA (monomérico) y de ZEHlyA (dimérico) se muestra en la parte superior.

La Figura 4 ilustra la secreción de polipéptidos V_{HH}-HlyA monoméricos (V_{amy}-HlyA) y diméricos (V_{amy}-ZHlyA). La Figura 4A es una representación esquemática de la estructura de los polipéptidos V_{amy}-HlyA y V_{amy}-ZhlyA que contienen la señal de secreción de 23 kDa (*hlyA*) del transportador de Hly de *E. coli* marcado con el epítipo E. La masa de dichos polipéptidos (en kDa), deducida de su secuencia de aminoácidos, se muestra a la derecha. La Figura 4B es una representación esquemática del polipéptido V_{amy}-ZHlyA (monomérico) marcado con el epítipo E y del polipéptido V_{amy}-ZHlyA (dimérico) marcado con el epítipo E y que contiene el dominio ZIP (bisagra de Ig,

cremallera de leucina, marca de 6xhis). La Figura 4C muestra los resultados de un Western blot en donde se pone de manifiesto la secreción de híbridos proteicos que tienen dominios V_{HH} y -EHlyA o -ZEHlyA. Las células de *E. coli* HB2151 (pVDL9.3) que llevan uno de los plásmidos indicados (p V_{amy} HlyA o p V_{amy} ZHlyA) se indujeron con IPTG (véase el Ejemplo 1, apartado relativo a los Materiales y Métodos, para más detalles), a la temperatura indicada, y la presencia de polipéptidos secretados marcados con el epítipo E en sobrenadantes de cultivos se determinó por inmunotransferencia con anticuerpo monoclonal anti-E marcado con POD. Los polipéptidos V_{amy} HlyA y V_{amy} ZHlyA de longitud completa se detectaron en los sobrenadantes de cultivos, junto con algunos fragmentos proteolíticos derivados de ellos. La Figura 4D es un gráfico del volumen de elución de los polipéptidos V_{amy} HlyA (círculo) y V_{amy} ZHlyA (triángulo) separados por cromatografía de filtración en gel, junto con patrones de proteínas de masa conocida (cuadrados) y detectados con inmunotransferencia con anticuerpo monoclonal anti-E marcado con POD. Los patrones de masa utilizados fueron los mismos que los utilizados en relación con la Figura 3.

La Figura 5 es una gráfica que ilustra la actividad de unión de los polipéptidos V_{HH} -HlyA monoméricos y diméricos. La unión de la α -amilasa mediante los polipéptidos V_{amy} HlyA y V_{amy} ZhlyA, a las concentraciones indicadas, se determinó mediante ELISA (véase el Ejemplo 1, apartado relativo a los Materiales y Métodos, para más detalles). Los minianticuerpos marcados con el epítipo E unidos se detectaron con anticuerpo monoclonal anti-E marcado con POD y lectura de la D.O. a 490 nm. Como controles de la especificidad se emplearon V_{itr} HlyA y V_{itr} ZhlyA. La unión previa a un antígeno control no relacionado (ovoalbúmina) se ha sustraído ($DO_{490nm} - 0,05$). Los datos presentados son la media de los triplicados de cada punto. Se realizaron dos experimentos adicionales independientes, que demostraron valores similares a los mostrados en la figura.

La Figura 6 muestra el mapa del plásmido pZEHlyA.

La Figura 7 muestra el mapa del plásmido pZEHlyA2-SD.

La Figura 8 muestra el mapa del plásmido p V_{amy} HlyA.

La Figura 9 muestra el mapa del plásmido p V_{amy} ZhlyA.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

En un aspecto, la invención proporciona una construcción de ADN, en adelante construcción de ADN de la invención, que comprende:

- a) una primera secuencia de ácido nucleico que contiene la secuencia de nucleótidos que codifica para un producto de interés;
- 5 b) una segunda secuencia de ácido nucleico que contiene la secuencia de nucleótidos que codifica para un dominio de dimerización; y
- c) una tercera secuencia de ácido nucleico que contiene la secuencia de nucleótidos que codifica para la α -hemolisina (HlyA) de *E. coli* o para un fragmento de dicha proteína que comprende la señal de reconocimiento del mecanismo de secreción del sistema transportador de Hly de *E. coli*, o una
10 secuencia de nucleótidos que codifica para un gen homólogo, o una secuencia de nucleótidos que codifica para una variante, natural o artificial, de HlyA o de un fragmento de la misma que comprende la señal de reconocimiento del mecanismo de secreción del sistema transportador de
15 Hly de *E. coli*;

en donde el extremo 3' de dicha primera secuencia de ácido nucleico está unido al extremo 5' de dicha segunda secuencia de ácido nucleico y el extremo 3' de dicha segunda secuencia de ácido nucleico está unido al extremo 5' de dicha tercera secuencia
20 de ácido nucleico.

La primera secuencia de ácido nucleico contiene la secuencia de nucleótidos que codifica para un producto de interés (gen de interés). El producto de interés puede ser eucarótico, procariótico, viral, etc. Prácticamente cualquier péptido o proteína
25 susceptible de ser expresado de forma recombinante puede ser utilizado en la construcción de ADN de la invención, por ejemplo, enzimas, inhibidores enzimáticos, hormonas, moléculas implicadas en la adhesión y/o señalización celular y compuesta por dominios, por ejemplo, inmunoglobulinas, etc. A modo ilustrativo, dicho producto de interés puede ser un antígeno inmunogénico tal como una proteína o un fragmento
30 antigénico de la misma procedente de un patógeno, por ejemplo, de un patógeno viral, bacteriano, de un parásito, etc., que puede causar infecciones en seres humanos o animales; un agente terapéutico, por ejemplo, un antígeno específico de tumor, un antígeno de una enfermedad auto-inmune, etc.; o una molécula inmunoreguladora, por

ejemplo, factores de crecimiento, citoquinas, tales como interleuquinas, interferones, etc. En una realización particular, dicho producto de interés es un minianticuerpo.

La segunda secuencia de ácido nucleico contiene la secuencia de nucleótidos que codifica para un dominio de dimerización. Un dominio de dimerización es una
 5 secuencia peptídica que promueve la dimerización en las proteínas que lo contienen. Prácticamente cualquier dominio de dimerización puede ser utilizado en la construcción de ADN de la invención, por ejemplo, hélices peptídicas, que contienen, al menos, una hélice, o una estructura formada por una hélice, una vuelta y otra hélice, etc., estructuras de doble arrollamiento helicoidal (coiled coil), y, en general, cualquier secuencia
 10 peptídica que promueva la dimerización en las proteínas que la contengan. En una realización particular, dicho dominio de dimerización comprende la cremallera de leucina del factor de transcripción GCN4 de levadura.

La tercera secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia de nucleótidos que codifica para la α -hemolisina (HlyA) de *E. coli* o para un fragmento de dicha
 15 proteína que comprende la señal de reconocimiento del mecanismo de secreción del sistema transportador de Hly de *E. coli*, o una secuencia de nucleótidos que codifica para un gen homólogo, o una secuencia de nucleótidos que codifica para una variante, natural o artificial, de HlyA o de un fragmento de la misma que comprende la señal de reconocimiento del mecanismo de secreción del sistema transportador de Hly de *E. coli*.
 20 La señal de reconocimiento del mecanismo de secreción del sistema transportador de Hly de *E. coli* parece estar comprendida en el extremo carboxilo terminal (C-terminal), concretamente dentro de los últimos 60 aminoácidos de HlyA. La secuencia de aminoácidos y nucleótidos de la HlyA de *E. coli* puede obtenerse de GeneBank, número de acceso M10133, donde también puede obtenerse la secuencia de nucleótidos de
 25 aminoácidos de Hlyb y HlyD. En una realización particular, dicha tercera secuencia de ácido nucleico está constituida por la secuencia de nucleótidos que codifica para la HlyA de *E. coli*. En otra realización particular, dicha tercera secuencia de ácido nucleico comprende un fragmento de la HlyA de *E. coli* que contiene la señal de reconocimiento del mecanismo de secreción del sistema transportador de Hly de *E. coli*, tal como una
 30 secuencia de nucleótidos que codifica para los 60 últimos aminoácidos del extremo C-terminal de HlyA de *E. coli*. En este caso, dicha tercera secuencia de ácido nucleico está constituida por, o comprende, la secuencia de nucleótidos que codifica para los 60 últimos aminoácidos del extremo C-terminal de HlyA de *E. coli*.

En una realización concreta de la invención, dicha tercera secuencia de ácido nucleico contiene la secuencia de nucleótidos identificada como SEQ ID NO: 1 que codifica para un péptido de aproximadamente 23 kDa del extremo carboxilo terminal de HlyA de *E. coli* cuya secuencia de aminoácidos se muestra en la SEQ ID NO: 2.

5 En general, el dominio de dimerización no se fusiona directamente al gen que codifica el producto de interés sino que es ventajoso introducir un péptido espaciador (flexible) entre el extremo del gen que codifica para el producto de interés y el comienzo del dominio de dimerización. Por tanto, si se desea, la construcción de ADN de la invención también puede contener, además, una cuarta secuencia de ácido nucleico
10 que codifica para un péptido espaciador situada entre dichas segunda y tercera secuencias de ácido nucleico, en donde el extremo 5' de dicha cuarta secuencia de ácido nucleico está unido al extremo 3' de dicha segunda secuencia de ácido nucleico y el extremo 3' de dicha cuarta secuencia de ácido nucleico está unido al extremo 5' de dicha tercera secuencia de ácido nucleico. De esta manera, la secuencia codificante del
15 producto de interés está unida al dominio de dimerización mediante un péptido espaciador. Ventajosamente, dicho péptido espaciador es un péptido con flexibilidad estructural. Prácticamente, cualquier péptido con flexibilidad estructural puede ser utilizado. A modo ilustrativo, dicho péptido flexible puede contener repeticiones de restos de aminoácidos, tales como Gly-Gly-Gly-Ser, o cualquier otra repetición de
20 restos de aminoácidos adecuada, o bien la región bisagra de un anticuerpo. En una realización particular, dicho péptido espaciador flexible comprende la región bisagra de un anticuerpo y la construcción de ADN de la invención contiene la secuencia codificante para dicho péptido flexible. En una realización concreta de la invención, dicha cuarta tercera secuencia de ácido nucleico contiene la secuencia de nucleótidos
25 identificada como SEQ ID NO: 3 que codifica para un péptido de 10 aminoácidos que comprende la región bisagra de un anticuerpo cuya secuencia de aminoácidos se muestra en la SEQ ID NO: 4.

Para facilitar el aislamiento y purificación del péptido o proteína de fusión obtenida mediante la presente invención, la construcción de ADN de la invención puede
30 contener, si se desea, una secuencia de ácido nucleico que codifica para un péptido susceptible de ser utilizado con fines de aislamiento o purificación del péptido o proteína de fusión. Por tanto, en una realización particular, la construcción de ADN de

la invención contiene, si se desea, una quinta secuencia de ácido nucleico que codifica para un péptido susceptible de ser utilizado con fines de aislamiento o purificación.

Prácticamente cualquier péptido o secuencia peptídica que permita el aislamiento o purificación del péptido o proteína de fusión puede ser utilizada, por ejemplo, una secuencia de polihistidina, una secuencia peptídica reconocida por un anticuerpo monoclonal y que puede servir para purificar la proteína de fusión resultante por cromatografía de inmunoafinidad, por ejemplo, péptidos etiqueta tales como c-myc, HA, E, FLAG, etc. [Using Antibodies: A laboratory manual. Ed Harlow and David Lane (1999). Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York. Capítulo: Tagging proteins. pp. 347-377] y, en general, cualquier otra secuencia reconocida por un anticuerpo.

Dicha quinta secuencia de ácido nucleico puede estar situada en cualquier posición de la construcción de ADN de la invención excepto en la región correspondiente al extremo C-terminal de HlyA ya que, en ese caso, rompería la señal de secreción. A modo ilustrativo, dicha quinta secuencia de ácido nucleico podría estar situada entre dichas primera y segunda secuencias de ácido nucleico, en donde el extremo 5' de dicha quinta secuencia de ácido nucleico está unido al extremo 3' de dicha primera secuencia de ácido nucleico y el extremo 3' de dicha quinta secuencia de ácido nucleico está unido al extremo 5' de dicha segunda secuencia de ácido nucleico. Alternativamente, dicha quinta secuencia de ácido nucleico podría estar situada en la región correspondiente al extremo N-terminal de la proteína de fusión resultante o entre el producto de interés y el dominio de dimerización.

Para facilitar el reconocimiento de la proteína o péptido de fusión obtenido, la construcción de ADN de la invención también puede contener, si se desea, una sexta secuencia de ácido nucleico que codifica para un péptido susceptible de ser utilizado con fines de reconocimiento.

Prácticamente cualquier péptido o secuencia peptídica que permita el reconocimiento del péptido o proteína de fusión puede ser utilizada, por ejemplo, una secuencia peptídica reconocida por un anticuerpo monoclonal y que puede servir para reconocer la proteína de fusión resultante por cromatografía de inmunoafinidad, por ejemplo, péptidos etiqueta tales como c-myc, HA, E, FLAG y, en general, cualquier otra secuencia reconocida por un anticuerpo.

Dicha sexta secuencia de ácido nucleico puede estar situada en cualquier posición de la construcción de ADN de la invención excepto en la región correspondiente al extremo C-terminal de HlyA para evitar que se rompa la señal de secreción. A modo ilustrativo, dicha sexta secuencia de ácido nucleico podría estar
5 situada entre dichas primera y segunda secuencias de ácido nucleico, en donde el extremo 5' de dicha sexta secuencia de ácido nucleico está unido al extremo 3' de dicha primera secuencia de ácido nucleico y el extremo 3' de dicha sexta secuencia de ácido nucleico está unido al extremo 5' de dicha segunda secuencia de ácido nucleico. Alternativamente, dicha sexta secuencia de ácido nucleico podría estar situada en la
10 región correspondiente al extremo N-terminal de la proteína de fusión resultante o entre el producto de interés y el dominio de dimerización.

Dichas quinta y sexta secuencias de ácido nucleico pueden estar separadas entre sí. Alternativamente, en una realización particular, dichas quinta y sexta secuencias de ácido nucleico pueden estar unidas entre sí. En este caso, a modo ilustrativo, dicha sexta
15 secuencia de ácido nucleico que codifica para un péptido susceptible de ser utilizado con fines de reconocimiento puede estar situada entre dichas primera y quinta secuencias de ácido nucleico, en donde el extremo 5' de dicha sexta secuencia de ácido nucleico está unido al extremo 3' de dicha primera secuencia de ácido nucleico y el extremo 3' de dicha sexta secuencia de ácido nucleico está unido al extremo 5' de dicha
20 quinta secuencia de ácido nucleico. Alternativamente, dichas secuencias pueden estar unidas entre sí en el orden inverso, en cuyo caso, dicha sexta secuencia de ácido nucleico que codifica para un péptido susceptible de ser utilizado con fines de reconocimiento está situada entre dichas primera y quinta secuencias de ácido nucleico, en donde el extremo 3' de dicha sexta secuencia de ácido nucleico está unido al extremo
25 5' de dicha primera secuencia de ácido nucleico y el extremo 5' de dicha sexta secuencia de ácido nucleico está unido al extremo 3' de dicha quinta secuencia de ácido nucleico.

Si se desea, la construcción de ADN de la invención puede contener, además, una secuencia de nucleótidos que codifica para una secuencia de aminoácidos susceptible de ser escindida específicamente por medios enzimáticos o químicos con el
30 fin de liberar el producto de interés una vez aislada la proteína de fusión. En este caso, la construcción de ADN de la invención puede incluir, además, una séptima secuencia de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para una

secuencia de aminoácidos susceptible de ser escindida específicamente por medios enzimáticos o químicos. Prácticamente cualquier secuencia de aminoácidos susceptible de ser escindida específicamente por medios enzimático o químicos puede ser utilizada. En una realización particular, dicha séptima secuencia de ácido nucleico comprende una

5 secuencia de nucleótidos que codifica para un sitio de reconocimiento de una proteasa, por ejemplo, una enteroquinasa, Arg-C endoproteasa, Glu-C endoproteasa, Lys-C endoproteasa, Factor de coagulación Xa y similares. En otra realización particular, dicha séptima secuencia de ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para un sitio susceptible de ser específicamente escindido por un reactivo

10 químico tal como, por ejemplo, bromuro de cianógeno que escinde restos de metionina o cualquier otro reactivo químico apropiado.

Dicha séptima secuencia de ácido nucleico se encuentra, generalmente, a continuación del extremo 3' de dicha primera secuencia de ácido nucleico que codifica para el producto de interés de manera.

15 La construcción de ADN de la invención puede obtenerse mediante el empleo de técnicas ampliamente conocidas en el estado de la técnica [Sambrook et al., "Molecular cloning, a Laboratory Manual", 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y., 1989 Vol 1-3]. Dicha construcción de ADN de la invención puede incorporar, operativamente unida, una secuencia reguladora de la expresión de la secuencia de

20 nucleótidos que codifica para el producto de interés, constituyendo de este modo un cassette de expresión.

Por tanto, en otro aspecto, la invención proporciona un cassette de expresión que comprende la construcción de ADN de la invención operativamente unida a una secuencia de control de expresión de la secuencia de nucleótidos que codifica para el

25 producto de interés. Las secuencias de control son secuencias que controlan y regulan la transcripción y, en su caso, la traducción del producto de interés, e incluyen secuencias promotoras (*pT7*, *plac*, *pBAD*, *ptet*, etc.), secuencias codificantes para reguladores transcripcionales (*lacI*, *tetR*, *araC*, etc.), secuencias de unión a ribosomas (RBS), y/o secuencias terminadoras de transcripción (*t1t2*, etc.), etc. En una realización particular,

30 dicha secuencia de control de expresión es funcional en bacterias, en particular, en bacterias Gram negativas.

Ventajosamente, dicho cassette de expresión comprende, además, un marcador o gen que codifica para un motivo o para un fenotipo que permita la selección de la célula

hospedadora transformada con dicho cassette de expresión. Ejemplos ilustrativos de dichos marcadores que podrían estar presentes en el cassette de expresión de la invención incluyen genes de resistencia a antibióticos, por ejemplo, ampicilina, tetraciclina, kanamicina, cloranfenicol, espectinomicina, etc., genes de resistencia a compuestos tóxicos (telurito, mercurio, etc.).

La construcción de ADN de la invención, o el cassette de expresión proporcionado por esta invención, pueden ser insertados en un vector apropiado. Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con un vector, tal como un vector de expresión, que comprende dicha construcción de ADN o dicho cassette de expresión. La elección del vector dependerá de la célula hospedadora en la que se va a introducir posteriormente. A modo de ejemplo, el vector donde se introduce dicha secuencia de ADN puede ser un plásmido o un vector que, cuando se introduce en una célula hospedadora, se integra o no en el genoma de dicha célula. La obtención de dicho vector puede realizarse por métodos convencionales conocidos por los técnicos en la materia [Sambrook et al., 1989, citado *supra*].

En otro aspecto, la invención se relaciona con una bacteria, en particular, una bacteria Gram negativa, que comprende una construcción de ADN de la invención o un cassette de expresión de la invención, en adelante bacteria de la invención. Dicha bacteria debe tener el sistema exportador de hemolisina (Hly) de *E. coli* para lo cual, si no lo tiene de forma nativa, se debe proporcionar dicho sistema a la bacteria transformándola con un vector que contenga los genes HlyB y Lid, por ejemplo, el plásmido pVDL9.3 [Fernández, L.A. et al., Applied and Environmental Microbiology, Nov. 2000, 5024-5029]. Prácticamente cualquier bacteria Gram negativa, por ejemplo, *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, etc., puede ser transformada con la construcción de ADN de la invención o con el cassette de expresión de la invención. Para ello, las señales promotoras, reguladoras, marcadoras y orígenes de replicación deben ser optimizados para cada especie bacteriano. En una realización particular, dicha bacteria Gram negativa es *Escherichia coli*.

La construcción de ADN de la invención puede ser utilizada para producir productos de interés. Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con un método para producir un producto de interés, en forma de una proteína de fusión dimérica, que comprende crecer una bacteria de la invención bajo condiciones que permiten la producción y excreción al medio de cultivo de dicho producto de interés en forma de

una proteína de fusión dimérica. Las condiciones para optimizar el cultivo de la bacteria de la invención dependerán de la bacteria utilizada.

Si se desea, el método para producir un producto de interés proporcionado por esta invención incluye, además, el aislamiento y purificación de dicha proteína de fusión dimérica. En este caso, la construcción de ADN de la invención incluye, además, dicha
5 séptima secuencia de ácido nucleico previamente definida que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para una secuencia de aminoácidos susceptible de ser escindida específicamente por medios enzimáticos o químicos con el fin de liberar el producto de interés una vez aislada la proteína de fusión. En una realización particular,
10 dicha secuencia de nucleótidos codifica para un sitio de reconocimiento de una proteasa, por ejemplo, una enteroquinasa, Arg-C endoproteasa, Glu-C endoproteasa, Lys-C endoproteasa, Factor de coagulación Xa y similares. En otra realización particular, dicha secuencia de nucleótidos codifica para un sitio susceptible de ser específicamente escindido por un reactivo químico tal como, por ejemplo, bromuro de cianógeno que
15 escinde restos de metionina o cualquier otro reactivo químico apropiado.

En otro aspecto, la invención se relaciona con una proteína de fusión dimérica obtenible por expresión de la secuencia de ácido nucleico contenida en la construcción de ADN de la invención, que comprende:

- (i) la secuencia de aminoácidos de la HlyA de *E. coli* o de un fragmento de
20 dicha proteína que comprende la señal de reconocimiento del mecanismo de secreción del sistema transportador de hemolisina (Hly) de *E. coli*;
- (ii) una secuencia de aminoácidos correspondiente a un dominio de dimerización; y
- (iii) la secuencia de aminoácidos de un producto de interés.

25

De forma más concreta, la proteína de fusión dimérica de la invención comprende

- (i) la secuencia completa de aminoácidos de HlyA de *E. coli*, o
alternativamente, un fragmento de HlyA de *E. coli* que comprende la
30 señal de reconocimiento del mecanismo de secreción del sistema transportador de Hly de *E. coli* [NOTA: Intentaré definir su secuencia de aminoácidos en base a la información que me facilitéis sobre la secuencia completa de aminoácidos de dicha proteína];

- (ii) un dominio de dimerización, tal como una hélice peptídica, una estructura de doble arrollamiento helicoidal (coiled coil), o, en general, cualquier secuencia peptídica que promueva la dimerización en las proteínas que la contengan. En una realización particular, dicho dominio de dimerización comprende la cremallera de leucina del factor de transcripción GCN4 de levadura; y
- (iii) un producto de interés, por ejemplo, una enzima, un inhibidor enzimático, una hormona, una molécula implicada en la adhesión y/o señalización celular y compuesta por dominios, por ejemplo, una inmunoglobulina, un antígeno inmunogénico, tal como una proteína o un fragmento antigénico de la misma procedente de un patógeno, por ejemplo, de un patógeno viral, bacteriano, de un parásito, etc., que puede causar infecciones en seres humanos o animales, un agente terapéutico, por ejemplo, un antígeno específico de tumor, un antígeno de una enfermedad auto-inmune, etc., o una molécula inmunoreguladora, por ejemplo, un factor de crecimiento, una citoquina, tal como una interleuquina, un interferón, etc.; en una realización particular, dicho producto de interés es un minianticuerpo susceptible de ser utilizado con fines terapéuticos, de diagnóstico o de investigación.
- La proteína de fusión dimérica de la invención también puede contener, si se desea, (a) un péptido espaciador entre el producto de interés y el dominio de dimerización; ventajosamente, dicho péptido espaciador es un péptido con flexibilidad estructural, por ejemplo, un péptido que contiene repeticiones de restos de aminoácidos, tales como Gly-Gly-Gly-Ser, o cualquier otra repetición de restos de aminoácidos adecuada, o bien la región bisagra de un anticuerpo; en una realización particular, dicho péptido espaciador flexible comprende la región bisagra de un anticuerpo; y/o (b) un péptido para facilitar el aislamiento o purificación del péptido o proteína de fusión, por ejemplo, una secuencia de polihistidina, o una secuencia peptídica reconocida por un anticuerpo monoclonal y que puede servir para purificar la proteína de fusión resultante por cromatografía de inmunoafinidad, por ejemplo, péptidos etiqueta tales como c-myc, HA, E, FLAG, y, en general, cualquier otra secuencia reconocida por un anticuerpo; y/o (c) un péptido que permita el reconocimiento del péptido o proteína de fusión, por ejemplo, una secuencia peptídica reconocida por un anticuerpo monoclonal y que puede

servir para reconocer la proteína de fusión resultante por cromatografía de inmunoafinidad, por ejemplo, péptidos etiqueta tales como c-myc, HA, E, FLAG y, en general, cualquier otra secuencia reconocida por un anticuerpo; y/o (d) una secuencia de aminoácidos susceptible de ser escindida específicamente por medios enzimáticos, por ejemplo, una secuencia de aminoácidos que constituye un sitio de reconocimiento de una proteasa, por ejemplo, una enteroquinasa, Arg-C endoproteasa, Glu-C endoproteasa, Lys-C endoproteasa, Factor de coagulación Xa y similares, o una secuencia de aminoácidos susceptible de ser específicamente escindida por un reactivo químico tal como, por ejemplo, bromuro de cianógeno y similares.

El sistema de producción de proteínas de fusión diméricas proporcionado por esta invención es particularmente útil para la producción de proteínas implicadas en una actividad de unión, por ejemplo, en las interacciones proteína-ADN o antígeno-anticuerpo, puesto que puede intensificar su avidéz.

Una ventaja del sistema proporcionado por esta invención radica en que permite producir proteínas tóxicas para un huésped bacteriano que, de no ser por ese sistema, no se podrían expresar en dicho huésped bacteriano debido a su toxicidad. Como es conocido, la expresión por métodos recombinantes de proteínas tóxicas para un huésped bacteriano es muy complicada o prácticamente imposible cuando dicha proteína tóxica expresada no es exportada desde la bacteria hacia el exterior. Con el método proporcionado por esta invención se puede expresar una proteína tóxica o previamente inexpressable, o expresada a bajos niveles, para producir la proteína deseada en cantidades utilizables.

El siguiente ejemplo ilustra la invención sin que deba ser considerado como limitativo del alcance de la misma.

25

EJEMPLO 1

Producción de minianticuerpos diméricos con elevada afinidad secretados por el sistema de transporte de hemolisina (Hly) de *E. coli*

En este ejemplo se describe la secreción de minianticuerpos diméricos en sobrenadantes de cultivos de *E. coli* que emplean el sistema de transporte de hemolisina (Hly). En primer lugar, se demostró que la dimerización puede conseguirse por ingeniería genética en el sistema de transporte de la Hly. Para ello se insertó una hélice α anfipática (es decir, el dominio de cremallera de leucina del factor de transcripción de

levaduras GCN4) en el extremo N terminal de una versión marcada (E-tag) del dominio C terminal de 23 kDa de la hemolisina (EHlyA). Se comprobó que el polipéptido resultante (ZEHlyA) se secretaba eficazmente por las células de *E. coli* y se acumulaba en el medio de cultivo como un dímero estable. Después se utilizaron los vectores

5 derivados de 'EHlyA y 'ZEHlyA para la secreción de los dominios V_{HH} de inmunoglobulinas obtenidos de anticuerpos de camello. Se secretaron los híbridos V_{HH}-EHlyA y V_{HH}-ZEHlyA y se encontraron en el medio extracelular como monómeros y dímeros, respectivamente. Cuando se compararon con sus homólogos monoméricos, las moléculas

10 diméricas V_{HH}-ZEHlyA mostraron propiedades superiores de unión a su antígeno relacionado, con un aumento de 10 veces en su afinidad funcional (avidez). Este procedimiento permite obtener fácilmente minianticuerpos V_{HH} monoméricos y diméricos con alta avidez a partir de los sobrenadantes de cultivos de *E. coli*, facilitando así la selección y la purificación de alto rendimiento de clones de V_{HH} a partir de grandes librerías.

15

1. MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas bacterianas, crecimiento y condiciones de inducción. Las cepas de *E. coli* K-12 empleadas eran DH5 α F' (*supE44* Δ (*lacZYA-argF*)U169 Φ 80(*lacZAM15*) *hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi1 relA1*; Invitrogen) para la clonación y la propagación de los

20 plásmidos y HB2151 (Δ *lac-pro*, *ara*, *nal^r*, *thi*, F'*proAB lacI^d lacZAM15*) [Carter, P., H. Bedouelle, and G. Winter 1985. Improved oligonucleotide site-directed mutagenesis using M13 vectors. *Nucleic Acids Res.* 13:4431-4443] para la expresión de proteínas. Las bacterias que contenían los plásmidos indicados en cada caso se hicieron crecer a 30°C en placas de agar LB [Miller, J. H. 1992. A short course in bacterial

25 genetics: a laboratory manual and handbook for *Escherichia coli* and related bacteria. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York] que contenía glucosa al 2% (p/v) (para reprimir el promotor *lac*) y los antibióticos apropiados para la selección de plásmidos. Para la inducción de los híbridos HlyA, se inocularon colonias individuales en el medio LB líquido que contenía glucosa al 2% (p/v) y se hicieron

30 crecer a 30°C o a 37°C hasta que a la densidad óptica a 600 nm (DO_{600 nm}) alcanzó un valor de 0,5 aproximadamente. En ese punto, las bacterias se recogieron por centrifugación, se resuspendieron a la misma densidad en LB que contenía isopropil-1-tio- β -D-galactósido (IPTG) 0,3 mM y se incubaron (a 30°C o a 37°C) con agitación

- (160 r.p.m.) durante un periodo de tiempo comprendido entre 4 y 16 h. Se recogieron los sobrenadantes del cultivo tras la eliminación de las células de *E. coli* por centrifugación (10.000xg, 10 min) y se añadió 1/10 del volumen de tampón fosfato salino (PBS) 10X concentrado [PBS: Na₂HPO₄ 8 mM, KH₂PO₄ 1,5 mM, KCl 3 mM, NaCl 137 mM, pH 7,0]. Los sobrenadantes del cultivo se emplearon directamente para realizar inmunoensayos o se almacenaron a -80°C hasta su utilización. Los antibióticos añadidos al medio de cultivo para la selección de plásmidos fueron la ampicilina (Ap; 150 µg/ml) y el cloranfenicol (Cm; 30 µg/ml).
- 10 **Plásmidos y oligonucleótidos.** Se emplearon métodos estándar para la manipulación y el aislamiento del ADN, la amplificación por PCR y la secuenciación del ADN [Ausubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, and K. Struhl 1994. Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons, New York; Sambrook, J., E. Fritsch, and T. Maniatis 1989. Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York]. Los oligonucleótidos se obtuvieron de Sigma Genosys (Reino Unido) o de Isogen Bioscience BV (Países Bajos). Los plásmidos pEHlyA (Ap^r), pEHlyA2-SD (Ap^r) y pVDL9.3 (Cm^r) ya han sido descritos [Fernández, L. A., and V. De Lorenzo 2001. Formation of disulphide bonds during secretion of proteins through the periplasmic-independent type I pathway Mol Microbiol. 40:332-46; Fernández, L. A., I. Sola, L. Enjuanes, and V. de Lorenzo 2000. Specific secretion of active single-chain Fv antibodies into the supernatants of *Escherichia coli* cultures by use of the hemolysin system Appl Environ Microbiol. 66:5024-5029; Tzschaschel, B. D., C. A. Guzman, K. N. Timmis, and V. de Lorenzo 1996. An *Escherichia coli* hemolysin transport system-based vector for the export of polypeptides: Export of Shiga-like toxin IIeB subunit by *Salmonella typhimurium aroA*. Nature Biotechnology. 14:765-769]. El plásmido pZEHlyA (Ap^r) se obtuvo insertando en el sitio único *SaII* de pEHlyA un fragmento de ADN de 170 pb que codifica para el dominio ZIP amplificado por PCR y digerido con *SaII*. El mapa del plásmido pZEHlyA se muestra en la Figura 6. La amplificación por PCR del dominio ZIP se llevó a cabo con la ADN polimerasa Vent (New England Biolabs), usando como molde 1 ng de pCLZIP (Codon Genetic Systems, GmbH), y como cebadores los oligonucleótidos identificados como SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6, que incorporaban dos sitios *SaII* flanqueando el producto amplificado. El plásmido

pZEHlyA2-SD (Ap^r) se obtuvo insertando en el sitio único *SaI*I de pEHlyA2-SD el fragmento de ADN de 170 pb que codifica para ZIP obtenido por digestión con *SaI*I de pZEHlyA. El mapa del plásmido pZEHlyA2-SD se muestra en la Figura 7. Se seleccionó la orientación del fragmento de ADN ZIP que producía una inserción interna en el dominio C-HlyA marcado con E de pZEHlyA y pZEHlyA2-SD tras la secuenciación del ADN. Los fragmentos de ADN de aproximadamente 0,3 kb que codificaban para los dominios V_{HH}, V_{amy} y V_{tx} se amplificaron por PCR con la ADN polimerasa Vent, usando como molde 1 ng de los fagémidos A100R3A2 (anti- α -amilasa) o R3E5 (vacuna antitetánica), respectivamente, y como cebadores los oligonucleótidos identificados como SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8.

Los productos amplificados de ADN que codifican para V_{amy} y V_{tx} contenían los sitios de restricción flanqueantes *Nco*I y *Sfi*I, lo que permitía su clonación en los mismos sitios de pEHlyA2-SD y pZEHlyA2-SD, generando así pV_{amy}HlyA, pV_{tx}HlyA, pV_{amy}ZhlyA y pV_{tx}ZhlyA. Los mapas de los plásmidos pV_{amy}HlyA y pV_{amy}ZhlyA se muestran en las Figuras 8 y 9, respectivamente. Los fagémidos A100R3A2 y R3E5 fueron proporcionados por el Dr. Hennie Hoogenboon (Dyax Co., EE. UU.). Ambos fagémidos son derivados de pCANTAB6 (Cambridge Research Biochemicals) que contienen los dominios V_{HH} de camélidos clonados entre los sitios *Sfi*I y *Not*I.

Electroforesis e inmunotransferencia de proteínas. Se llevó a cabo la electroforesis en geles de dodecil sulfato sódico - poliacrilamida (SDS-PAGE) usando geles de apilamiento al 4% y de separación al 10% (acrilamida:bisacrilamida 29:1; Bio-Rad), utilizando el sistema de electroforesis Miniprotean® (Bio-Rad) y siguiendo los protocolos estándar [Ausubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, and K. Struhl 1994. Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons, New York; Fraile, S., F. Roncal, L. A. Fernandez, and V. de Lorenzo 2001. Monitoring Intracellular Levels of XylR in *Pseudomonas putida* with a Single-Chain Antibody Specific for Aromatic-Responsive Enhancer-Binding Proteins J Bacteriol. 183:5571-9]. Para la inmunotransferencia, las proteínas se transfirieron a una membrana de difloruro de polivinilideno (Immobilon-P, Millipore) usando un aparato de electroforesis por transferencia semiseca (Bio-Rad). La membrana se bloqueó en tampón MTP (leche desnatada al 3% p/v, Tween 20 al 0,1% v/v en PBS) y se detectaron los polipéptidos marcados con E con anticuerpo monoclonal anti-E marcado con

peroxidasa (0,2 µg/ml en tampón MTP; Amersham Bioscience). El conjugado anticuerpo-POD unido se reveló mediante quimioluminiscencia, tal como ya se ha descrito [Fraile, S., F. Roncal, L. A. Fernandez, and V. de Lorenzo 2001. Monitoring Intracellular Levels of XylR in *Pseudomonas putida* with a Single-Chain Antibody Specific for Aromatic-Responsive Enhancer-Binding Proteins J Bacteriol. 183:5571-9].

La membrana se expuso a una película de rayos X (X-OMAT®, Kodak) o a ChemiDoc® (Bio-Rad) para la cuantificación por quimioluminiscencia (software Quantity-one®; Bio-Rad). Las concentraciones de los polipéptidos HlyA marcados con E secretados presentes en los sobrenadantes del cultivo de *E. coli* se determinaron por la intensidad de sus bandas de proteínas correspondientes en geles de SDS-poliacrilamida teñidos con plata [Ansorge, W. 1985. Fast and sensitive detection of protein and DNA bands by treatment with potassium permanganate J. Biochem. Biophys. Methods. 11:13-20] y mediante inmuno-transferencia usando anticuerpo monoclonal anti-E marcado con POD. Se usaron diluciones seriadas de scFvs marcados con E purificados, de concentración conocida, como patrones en estos experimentos.

Entrecruzamiento de proteínas. Antes de su incubación con el agente de entrecruzamiento bifuncional glutarato de disuccinimidilo (DSG, 7.7 Å spacer; Pierce), los polipéptidos de HlyA marcados con E presentes en los sobrenadantes de los cultivos se equilibraron en el mismo volumen de PBS por ultrafiltración a través de una membrana con punto de corte de 10 kDa (Microcon 10, Millipore) que eliminó los compuestos pequeños con grupos amino libres presentes en el medio de cultivo. El entrecruzamiento se llevó a cabo durante 30 minutos a temperatura ambiente añadiendo DBS 40 ó 130 µM a muestras de proteínas de 50 µl equilibradas en PBS. Tras esta incubación, el agente de entrecruzamiento se inactivó con Tris-HCl 50 mM (pH 7,5) durante 15 minutos y se añadió un volumen de tampón de muestra SDS-PAGE 2X concentrado [Fraile, S., F. Roncal, L. A. Fernandez, and V. de Lorenzo 2001. Monitoring Intracellular Levels of XylR in *Pseudomonas putida* with a Single-Chain Antibody Specific for Aromatic-Responsive Enhancer-Binding Proteins J Bacteriol. 183:5571-9]. Tras hervir durante 5 minutos, se cargaron 10 µl para el SDS-PAGE.

Cromatografía por exclusión de tamaño. Los sobrenadantes del cultivo (aproximadamente 0,2 ml) que contenían PBS 1X se mezclaron con 2 mg de proteína

patrón de masa conocida (disuelta en 60 μ l de H₂O) y se hicieron pasar a través de una resina Bio-Gel A de 1,5m (Bio-Rad) empaquetada en una columna de 1 m de longitud y 1,5 cm de ancho (Bio-Rad). Los patrones de filtración del gel (Bio-Rad) fueron la tiroglobulina (PM 670.000), la gammaglobulina bovina (PM 158.000), la ovoalbúmina de pollo (PM 44.000), la mioglobina equina (PM 17.000) y la vitamina B-12 (PM 1.350). La velocidad de flujo de la muestra a través de la columna se fijó a 0,2 ml/min usando una bomba peristáltica (P-1, Amersham Bioscience). El volumen de vacío de la columna se calculó mediante la elución de azul de dextrano 2000 (Amersham Bioscience). La elución de los patrones de proteínas a través de la columna se monitorizó mediante absorción de luz UV (Uvicord S II, Amersham Bioscience). Se recogieron fracciones de 1 ml (colector RediFrac, Amersham Bioscience) y se concentraron 10 veces mediante precipitación con ácido tricloroacético (TCA) al 10% (p/v) y 10 μ g de albúmina sérica bovina (BSA, Roche) que actuaba como transportador. La presencia de proteínas HlyA marcadas con E en estas fracciones se detectó por Western blot utilizando un anticuerpo monoclonal anti-E marcado con POD (véase más arriba).

Ensayos de inmunoabsorción ligados a enzima (ELISA). Los antígenos (α -amilasa u ovoalbúmina; Sigma) se adsorbieron durante 1 h a 37°C a inmunoplasacas de microtitulación de 96 pocillos (Maxisorb, Nunc) a 200 μ g/ml en PBS. Se lavó el exceso de antígeno y las placas se bloquearon durante 16 h a 4°C en tampón MTP (véase anteriormente). Los minianticuerpos se diluyeron en tampón MTP, se añadieron a los pocillos a las concentraciones indicadas en cada caso y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente. A continuación, los anticuerpos no unidos se eliminaron mediante cuatro lavados de los pocillos con PBS que contenía Tween 20 al 0,1% (v/v). El conjugado anticuerpo monoclonal anti-E marcado con POD (0,2 μ g/ml en tampón MTP) se añadió a los pocillos y se incubó adicionalmente durante 1 h a temperatura ambiente para detectar los minianticuerpos unidos marcados con E. Tras lavar como antes, las placas se revelaron usando *o*-fenilenediamina (Sigma). Se dejó continuar la reacción durante 10 minutos en oscuridad, se paró con HCl 0,6 N y se determinó la DO a 490nm de los pocillos (lector de microplacas Benchmark, Bio-Rad).

2. RESULTADOS

Dimerización por ingeniería genética de la señal de secreción de HlyA. En primer lugar, se investigó si la dimerización de C-HlyA podría realizarse por ingeniería genética sin afectar a su secreción. Se seleccionó un corto dominio de unos 6 kDa aproximadamente, denominado ZIP, que se había utilizado para la dimerización de scFvs en el periplasma de *E. coli* [Kerschbaumer, R. J., S. Hirschl, A. Kaufmann, M. Ibl, R. Koenig, and G. Himmler 1997. Single-chain Fv fusion proteins suitable as coating and detecting reagents in a double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay Anal Biochem. 249:219-27; Pack, P., and A. Plückthun 1992. Miniantibodies: use of amphipathic helices to produce functional, flexibly linked dimeric FV fragments with high avidity in Escherichia coli Biochemistry. 31:1579-84] para su inserción en C-HlyA. El dominio ZIP consta de una hélice anfipática que forma la cremallera de leucina del factor de transcripción de levaduras GCN4, flanqueado en su extremo N terminal por una zona bisagra peptídica derivada de la IgG3 del ratón, y en su extremo C terminal por un marcador de polihistidina (6xhis). Se insertó un fragmento de ADN que codificaba para el dominio ZIP internamente cerca del extremo N terminal de la versión de aproximadamente 27 kDa marcada con E de C-HlyA (EHlyA) presente en el plásmido pEHlyA (Figura 1A). El plásmido resultante, pZEHlyA, codifica para un polipéptido de aproximadamente 33 kDa (denominado ZEHlyA) que contiene los dominios ZIP y C-HlyA marcados con E (Figuras 1A y 1B).

La producción de ZEHlyA y EHlyA, como control sin ZIP, se indujo en cultivos de células TolC⁺ de tipo salvaje de *E. coli* (por ejemplo, la cepa HB2151) que llevaban pVDL9.3, que codifica para HlyB y HlyD, y que alojaban pZEHlyA o pEHlyA, respectivamente. Como se muestra en la Figura 1C, se encontraron ambos polipéptidos en niveles similares (aproximadamente 10 µg/ml) en los sobrenadantes de los cultivos de *E. coli* crecidos a 37°C tras la inducción de 4 h con IPTG 0,3 mM. Estas proteínas se detectaron en virtud del péptido marcado con E incorporado en sus secuencias con anticuerpo monoclonal anti-E marcado con POD (Métodos). La secreción de ambos polipéptidos derivados de HlyA fue específica y dependiente de la expresión de los componentes HlyB y HlyD por *E. coli* (datos no mostrados) [Fernández, L. A., and V. De Lorenzo 2001. Formation of disulphide bonds during secretion of proteins through the periplasmic-independent type I pathway Mol Microbiol. 40:332-46]. Este resultado

indicaba que la presencia del dominio de dimerización ZIP no tenía efecto en la eficacia de la exportación de la señal de C-HlyA.

A continuación, se investigó el estado de oligomerización de los polipéptidos secretados. Se incubaron muestras de alícuotas que contenía los polipéptidos secretados EHlyA o ZEHlyA con el agente de entrecruzamiento bifuncional glutarato de disuccinimidilo (DSG) y luego se sometieron a SDS-PAGE desnaturalizante y a inmunotransferencia con anticuerpo monoclonal anti-E marcado con POD (Métodos). En este experimento, sólo se entrecizaron las muestras de ZEHlyA a baja concentración de DSG (40 μ M) para formar una banda de proteínas con una masa molecular (Mr) aparente de aproximadamente 66 kDa (Figura 2, carril 5), lo que estaba de acuerdo con el tamaño esperado para un dímero de ZEHlyA. La concentración más elevada de DSG (130 μ M) intensificó la intensidad de la banda correspondiente a ZEHlyA dimérico (Figura 2, carril 6) mientras que sólo tenía una reactividad menor sobre EHlyA control (Figura. 2, carril 3).

También se demostró la dimerización de ZEHlyA mediante cromatografía por exclusión de tamaño. Se separaron muestras de alícuotas de sobrenadantes de cultivos que contenían EHlyA o ZEHlyA secretados en una columna de filtración en gel, con un límite de exclusión de 1.500 kDa, junto con proteínas de masa conocida utilizadas como patrones (Métodos). Como se muestra en la Figura 3A, ZEHlyA mostró una Mr aparente de aproximadamente 66 kDa en la cromatografía de filtración en gel, mientras que EHlyA tuvo una Mr aparente de aproximadamente 32 kDa en las mismas condiciones. Es importante que se detectara un único pico para cada proteína (Figura 3B), lo que indica que ambos polipéptidos estaban presentes como monómeros (EHlyA) y dímeros (ZEHlyA) estables en disolución. Considerados juntos, estos resultados demostraron que podría obtenerse la dimerización de proteínas mediante la incorporación de hélices anfipáticas en C-HlyA sin interferir con su secreción por el transportador de Hly.

Secreción de minianticuerpos diméricos por el sistema de la Hly de *E. coli*. A la vista de los resultados previamente obtenidos se procedió a estudiar si los fragmentos de anticuerpos diméricos podían secretarse mediante el sistema de la Hly. En primer lugar, se construyó un plásmido, denominado pZEHlyA2-SD, para generar fusiones internas entre los fragmentos de anticuerpos recombinantes que carecen del dominio N-SP y

ZEHlyA. Este plásmido es un derivado de pEHlyA2-SD [Fernández, L. A., I. Sola, L. Enjuanes, and V. de Lorenzo 2000. Specific secretion of active single-chain Fv antibodies into the supernatants of *Escherichia coli* cultures by use of the hemolysin system Appl Environ Microbiol. 66:5024-5029], en el que se insertó un fragmento de

5 ADN que codifica para el dominio ZIP en un único sitio *SalI*, entre la secuencia de poliunión y el dominio C-HlyA marcado con E (Métodos). Se seleccionaron dos anticuerpos de camello V_{HH} , frente a α -amilasa (*amy*) o la vacuna antitetánica (*ttx*), para determinar su expresión como híbridos con los restos 'EHlyA y 'ZEHlyA (Figuras 4A y 4B). El empleo de anticuerpos de camello V_{HH} como pares de fusión se debió a su

10 pequeño tamaño (aproximadamente 15 kDa) y a su baja tendencia a formar agregados de proteínas [Muyldermans, S. 2001. Single domain camel antibodies: current status J Biotechnol. 74:277-302; Plückthun, A., and P. Pack 1997. New protein engineering approaches to multivalent and bispecific antibody fragments Immunotechnology 3:83-105], lo que podría interferir con el análisis de la dimerización obtenida por el dominio

15 ZIP (véase Discusión). Las células de *E. coli* HB2151 (pVDL9.3) se transformaron con un plásmido que codificaba para el híbrido V_{HH} -HlyA (pV_{amy} HlyA, pV_{amy} ZHlyA, pV_{ttx} HlyA o pV_{ttx} ZHlyA) y se indujeron 4 h por la adición de IPTG 0,3 mM a los cultivos líquidos crecidos en LB a 30 ó 37 °C. Los polipéptidos secretados V_{amy} HlyA y V_{amy} ZHlyA se detectaron posteriormente en los sobrenadantes de los cultivos

20 correspondientes de *E. coli* por Western blot con anticuerpo monoclonal anti-E marcado con POD (Figura 4C). En estas condiciones, la concentración final de V_{amy} HlyA y V_{amy} ZHlyA fue de aproximadamente 2 μ g/ml a 37°C, y se redujo aproximadamente en 2 veces en los cultivos que crecieron a 30°C. Resultados similares se obtuvieron con V_{ttx} HlyA y V_{ttx} ZHlyA (datos no mostrados).

25 El estado de oligomerización de los híbridos V_{HH} -HlyA secretados se sometió a ensayo mediante cromatografía de filtración en gel (Figura 4D). Muestras de alícuotas de sobrenadantes de cultivos de *E. coli* que contenían V_{amy} HlyA o V_{amy} ZHlyA se cargaron en una columna de filtración en gel (límite de exclusión de 1.500 kDa), junto con proteínas de masa conocida. A partir de sus perfiles de elución puede deducirse

30 (Figura 4D) que el híbrido V_{amy} HlyA tenía una M_r aparente de aproximadamente 40 kDa, lo que estaba completamente de acuerdo con la masa esperada para un monómero de este polipéptido. Por el contrario, V_{amy} ZHlyA mostró una M_r aparente de aproximadamente 95 kDa, que es aproximadamente el doble de la masa esperada de su

monómero (es decir, 47 kDa). Hay que mencionar que la temperatura a la que se indujeron los cultivos de *E. coli* (30°C ó 37°C) no tuvo ninguna influencia en el comportamiento cromatográfico de estas muestras. Por lo tanto, la secreción de los anticuerpos de camello V_{HH} monoméricos o diméricos pueden producirse fusionándolos a los restos EHlyA o ZEHlyA, respectivamente.

A continuación, se probó si la dimerización mejoraba las propiedades de unión funcional de $V_{amy}ZHlyA$. Para este fin, se comparó la unión a la α -amilasa de $V_{amy}HlyA$ monomérico y de $V_{amy}ZHlyA$ dimérico mediante ELISA. En estos experimentos, se incubaron diluciones seriadas de sobrenadantes de cultivos de *E. coli* que contenían cantidades idénticas de $V_{amy}HlyA$ o $V_{amy}ZHlyA$ con placas de ELISA recubiertas con α -amilasa u ovoalbúmina (como antígeno control). Tras el lavado, los minianticuerpos unidos se detectaron con el conjugado anticuerpo monoclonal anti-E marcado con POD y se realizó la lectura a la DO_{490nm} (Métodos). La unión específica de la α -amilasa se demostró incubando estas placas con $V_{tx}HlyA$ y $V_{tx}ZHlyA$. En la Figura 5 se muestra el resultado de un ELISA prototipo de estos experimentos. La unión previa a ovoalbúmina (en todos los casos la DO_{490nm} 0,05) se ha sustraído de los valores presentados. Tal como se indica, la molécula $V_{amy}ZHlyA$ dimérica presentó una afinidad funcional mayor frente a la α -amilasa, que $V_{amy}HlyA$ monomérica. No se observó unión a α -amilasa con los derivados control de V_{tx} (Figura 5) ni con los polipéptidos EHlyA y ZEHlyA (datos no mostrados). En general, al menos se requirió una concentración diez veces mayor de $V_{amy}HlyA$ monomérico para lograr señales de unión a la α -amilasa similares a las obtenidas con $V_{amy}ZHlyA$. Además, en la concentración de saturación de ambos minianticuerpos (aproximadamente 0,5 $\mu g/ml$) la unión obtenida con $V_{amy}ZHlyA$ alcanzó un nivel meseta superior. Por tanto, la dimerización de $V_{amy}ZHlyA$ induce un efecto de avidéz sobre este minianticuerpo que se refleja en una mayor afinidad de unión funcional a su antígeno.

3. DISCUSIÓN

La dimerización es una propiedad que con frecuencia se desea conseguir por ingeniería genética en las proteínas cuando está implicada una actividad de unión (por ejemplo, en las interacciones proteína-ADN o antígeno-anticuerpo), puesto que puede intensificar su afinidad funcional (avidez).

Este ejemplo ilustra la obtención por ingeniería genética, por primera vez, de la dimerización de las proteínas secretadas por el sistema de transporte de hemolisina de *E. coli* y se ha empleado esa tecnología para producir minianticuerpos de alta avidez derivados de los anticuerpos de camello V_{HH} .

Los resultados obtenidos demuestran que la incorporación de una hélice anfipática de autodimerización en el extremo N terminal de C-HlyA no interfiere con la secreción de Hly y permite la dimerización del polipéptido secretado. Tal como se muestra, la dimerización puede intensificar la avidez de la unión del polipéptido secretado derivado de C-HlyA. Además, también puede tener otras aplicaciones, como la asociación molecular de varios antígenos y/o adyuvantes producidos por cepas bacterianas vivas, o la combinación de diversas actividades biológicas para la generación de moléculas biespecíficas (por ejemplo, la unión a un antígeno y el reclutamiento del complemento).

El scFvs dimérico de alta avidez se ha producido en el periplasma de las células de *E. coli* insertando hélices anfipáticas en su extremo C terminal. Inicialmente parecía sencillo probar si scFv dimérico podía secretarse fusionándolos a 'ZEHlyA. Sin embargo, la tendencia reconocida de scFvs a formar dímeros y agregados de proteínas de elevado peso molecular indujo a utilizar fragmentos más pequeños de anticuerpos. De hecho, cuando se investigó el estado de oligomerización de un híbrido scFv-HlyA (6AC3HlyA) mediante cromatografía de filtración en gel, se encontró que forma un número discreto de especies moleculares que difieren en su masa aparente [es decir, a 30°C. aproximadamente el 50% tenía la masa del monómero, Mr 55 kDa aproximadamente, mientras que el resto tenía una Mr aparente de aproximadamente 115, aproximadamente 170 e igual o superior a 350 kDa (datos no publicados)].

Los anticuerpos de camello V_{HH} han recibido mucha atención debido a su mejor solubilidad y a su estructura más simple, lo que facilita su amplificación y clonaje. Merece la pena destacar que los cambios efectuados no disminuyen la afinidad ni la especificidad de los anticuerpos de camello V_{HH} , debido a la presencia de regiones

determinantes de la complementaridad (CDR) extremadamente variables que compensan la pérdida de diversidad provocada por la ausencia de un dominio V_L . Los anticuerpos de camello también han demostrado un potencial extraordinario como inhibidores enzimáticos puesto que sus grandes CDR pueden alcanzar los sitios activos escondidos en las enzimas. Además, la similitud entre los anticuerpos de camello V_{HH} y las secuencias de la familia VH3 humana está permitiendo la generación de librerías presentadas en fagos de los dominios V_H humanos camelizados y de los anticuerpos de camello V_{HH} humanizados.

Los beneficios expuestos anteriormente motivaron a los inventores a utilizar los dominios V_{HH} para su secreción por el translocador de hemolisina de *E. coli*. Los resultados obtenidos muestran que los anticuerpos de camello funcionales, tanto en la forma monomérica como en la dimérica, pueden recuperarse de los sobrenadantes del cultivo de *E. coli* a niveles similares a los obtenidos en su expresión periplásmica (aproximadamente 1 mg/litro de cultivo a $D.O_{600nm} = 1$). Además, la dimerización provocada por ZEHlyA indujo un aumento de diez veces en la afinidad funcional de V_{amy} . Este valor está dentro del intervalo esperado producido por el cambio de anticuerpos monovalentes a divalentes. En conclusión, estos datos demuestran que el sistema de secreción de Hly puede emplearse para la secreción de polipéptidos y minianticuerpos diméricos de alta avidéz. La simplicidad de esta tecnología puede ser extremadamente útil para la selección de alto rendimiento de las librerías de anticuerpos.

REIVINDICACIONES

1. Una construcción de ADN que comprende:

- a) una primera secuencia de ácido nucleico que contiene la secuencia de nucleótidos que codifica para un producto de interés;
- 5 b) una segunda secuencia de ácido nucleico que contiene la secuencia de nucleótidos que codifica para un dominio de dimerización; y
- c) una tercera secuencia de ácido nucleico que contiene la secuencia de nucleótidos que codifica para la α -hemolisina (HlyA) de *E. coli* o para un
10 fragmento de dicha proteína que comprende la señal de reconocimiento del mecanismo de secreción del sistema transportador de Hly de *E. coli*, o una secuencia de nucleótidos que codifica para un gen homólogo, o una secuencia de nucleótidos que codifica para una variante, natural o artificial, de HlyA o de un fragmento de la misma que comprende la señal de
15 reconocimiento del mecanismo de secreción del sistema transportador de Hly de *E. coli*;

en donde el extremo 3' de dicha primera secuencia de ácido nucleico está unido al extremo 5' de dicha segunda secuencia de ácido nucleico y el extremo 3' de dicha segunda secuencia de ácido nucleico está unido al extremo 5' de dicha tercera secuencia de ácido nucleico.

2. Construcción de ADN según la reivindicación 1, en la que dicho producto de interés se selecciona entre enzimas, inhibidores enzimáticos, hormonas, moléculas implicadas en la adhesión y/o señalización celular y compuesta por dominios, antígenos
25 inmunogénicos, agentes terapéuticos, y moléculas inmunoreguladoras.

3. Construcción de ADN según la reivindicación 2, en la que dicho producto de interés se selecciona entre antígenos específicos de tumor, antígenos de enfermedades auto-inmune, factores de crecimiento, citoquinas, interleuquinas, interferones y
30 minianticuerpos.

4. Construcción de ADN según la reivindicación 1, en la que dicho dominio de dimerización comprende una hélice peptídica o una estructura de doble arrollamiento helicoidal (coiled coil).

5 5. Construcción de ADN según la reivindicación 4, en la que dicho dominio de dimerización comprende la cremallera de leucina del factor de transcripción GCN4 de levadura.

10 6. Construcción de ADN según la reivindicación 1, en la que dicha tercera secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia de nucleótidos que codifica para la α -hemolisina (HlyA) de *E. coli* o para un fragmento de dicha proteína que comprende la señal de reconocimiento del mecanismo de secreción del sistema transportador de Hly de *E. coli*, o una secuencia de nucleótidos que codifica para un gen homólogo, o una secuencia de nucleótidos que codifica para una variante, natural o artificial, de HlyA o de un
15 fragmento de la misma que comprende la señal de reconocimiento del mecanismo de secreción del sistema transportador de Hly de *E. coli*.

7. Construcción de ADN según la reivindicación 6, en la que dicha tercera secuencia de ácido nucleico se selecciona entre:

- 20 a) la secuencia de nucleótidos que codifica para la HlyA de *E. coli*;
b) una secuencia de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica para los 60 últimos aminoácidos del extremo C-terminal de HlyA de *E. coli*;
c) una secuencia de ácido nucleico constituida por una secuencia de
25 nucleótidos que codifica para los 60 últimos aminoácidos del extremo C-terminal de HlyA de *E. coli*;
d) la secuencia de nucleótidos identificada como SEQ ID NO: 1; y
e) una secuencia de nucleótidos que codifica para la secuencia de aminoácidos identificada como SEQ ID NO: 2.

30

8. Construcción de ADN según la reivindicación 1, que comprende, además, una cuarta secuencia de ácido nucleico que codifica para un péptido espaciador situada entre dichas segunda y tercera secuencias de ácido nucleico, en donde el extremo 5' de dicha cuarta

secuencia de ácido nucleico está unido al extremo 3' de dicha segunda secuencia de ácido nucleico y el extremo 3' de dicha cuarta secuencia de ácido nucleico está unido al extremo 5' de dicha tercera secuencia de ácido nucleico.

- 5 9. Construcción de ADN según la reivindicación 8, en la que dicho péptido espaciador comprende repeticiones de restos de aminoácidos, preferentemente, repeticiones Gly-Gly-Gly-Ser.
- 10 10. Construcción de ADN según la reivindicación 8, en el que dicho péptido espaciador es una región bisagra de un anticuerpo.
- 15 11. Construcción de ADN según la reivindicación 1, que comprende, además, una quinta secuencia de ácido nucleico que codifica para un péptido susceptible de ser utilizado con fines de aislamiento o purificación.
- 20 12. Construcción de ADN según la reivindicación 11, en la que dicho péptido susceptible de ser utilizado con fines de aislamiento o purificación comprende una secuencia de polihistidina o una secuencia peptídica reconocida por un anticuerpo monoclonal y que puede servir para purificar la proteína de fusión resultante por cromatografía de inmunoadfinidad.
- 25 13. Construcción de ADN según la reivindicación 11, en la que dicha quinta secuencia de ácido nucleico está situada entre dichas primera y segunda secuencias de ácido nucleico, en donde el extremo 5' de dicha quinta secuencia de ácido nucleico está unido al extremo 3' de dicha primera secuencia de ácido nucleico y el extremo 3' de dicha quinta secuencia de ácido nucleico está unido al extremo 5' de dicha segunda secuencia de ácido nucleico.
- 30 14. Construcción de ADN según la reivindicación 1, que comprende, además, una sexta secuencia de ácido nucleico que codifica para un péptido susceptible de ser utilizado con fines de reconocimiento.

15. Construcción de ADN según la reivindicación 14, en la que dicho péptido susceptible de ser utilizado con fines de reconocimiento comprende una secuencia peptídica reconocida por un anticuerpo monoclonal y que puede servir para reconocer la proteína de fusión resultante por cromatografía de inmunoafinidad.

5

16. Construcción de ADN según la reivindicación 15, en la que dicho péptido susceptible de ser utilizado con fines de reconocimiento comprende la secuencia del epítipo E.

10

17. Construcción de ADN según la reivindicación 14, en la que dicha sexta secuencia de ácido nucleico está situada entre dichas primera y segunda secuencias de ácido nucleico, en donde el extremo 5' de dicha sexta secuencia de ácido nucleico está unido al extremo 3' de dicha primera secuencia de ácido nucleico y el extremo 3' de dicha sexta secuencia de ácido nucleico está unido al extremo 5' de dicha segunda secuencia de

15

18. Construcción de ADN según la reivindicación 11 ó 14, en la que dichas quinta y sexta secuencias de ácido nucleico están separadas entre sí.

20

19.- Construcción de ADN según la reivindicación 11 ó 14, en la que dichas quinta y sexta secuencias de ácido nucleico están unidas entre sí.

25

20. Construcción de ADN según la reivindicación 19, en la que dicha sexta secuencia de ácido nucleico está situada entre dichas primera y quinta secuencias de ácido nucleico, en donde el extremo 5' de dicha sexta secuencia de ácido nucleico está unido al extremo 3' de dicha primera secuencia de ácido nucleico y el extremo 3' de dicha sexta secuencia de ácido nucleico está unido al extremo 5' de dicha quinta secuencia de ácido nucleico.

30

21. Construcción de ADN según la reivindicación 19, en la que dicha sexta secuencia de ácido nucleico está situada entre dichas primera y quinta secuencias de ácido nucleico, en donde el extremo 3' de dicha sexta secuencia de ácido nucleico está unido al extremo 5' de dicha primera secuencia de ácido nucleico y el extremo 5' de dicha sexta

secuencia de ácido nucleico está unido al extremo 3' de dicha quinta secuencia de ácido nucleico.

- 5 22. Construcción de ADN según la reivindicación 1, que comprende, además, una séptima secuencia de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para una secuencia de aminoácidos susceptible de ser escindida específicamente por medios enzimáticos o químicos.
- 10 23. Construcción de ADN según la reivindicación 22, en la que dicha séptima secuencia de ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para un sitio de reconocimiento de una proteasa.
- 15 24. Construcción de ADN según la reivindicación 23, en la que dicha proteasa se selecciona entre una enteroquinasa, Arg-C endoproteasa, Glu-C endoproteasa, Lys-C endoproteasa y Factor de coagulación Xa.
- 20 25. Construcción de ADN según la reivindicación 24, en la que dicha séptima secuencia de ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para un sitio susceptible de ser específicamente escindido por un reactivo químico.
- 25 26. Construcción de ADN según la reivindicación 25, en la que dicho reactivo químico es bromuro de cianógeno.
27. Construcción de ADN según la reivindicación 22, en la que dicha séptima secuencia de ácido nucleico se encuentra a continuación del extremo 3' de dicha primera secuencia de ácido nucleico.
- 30 28. Un cassette de expresión que comprende una construcción de ADN según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 27 operativamente unida a una secuencia de control de expresión de la secuencia de nucleótidos que codifica para el producto de interés.

29. Cassette de expresión según la reivindicación 28, en la que dicha secuencia de control de expresión de la secuencia de nucleótidos que codifica para el producto de interés comprende una secuencia promotora, una secuencia codificante para reguladores transcripcionales, una secuencia de unión a ribosomas (RBS) y/o una secuencia terminadora de transcripción.
30. Cassette de expresión según la reivindicación 28, que comprende, además, un marcador.
31. Cassette de expresión según la reivindicación 30, en el que dicho marcador comprende un gen de resistencia a antibióticos o un gen de resistencia a compuestos tóxicos.
32. Cassette de expresión según la reivindicación 28, en el que dicha secuencia de control de expresión es funcional en bacterias.
33. Una bacteria Gram negativa que comprende una construcción de ADN según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 27 o un cassette de expresión según cualquiera de las reivindicaciones 28 a 32.
34. Bacteria según la reivindicación 33, seleccionada entre *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Pseudomonas putida*.
35. Un método para producir un producto de interés, en forma de una proteína de fusión dimérica, que comprende crecer una bacteria según la reivindicación 33 ó 34 bajo condiciones que permiten la producción y excreción al medio de cultivo de dicho producto de interés en forma de una proteína de fusión dimérica.
36. Método según la reivindicación 35, que comprende, además, el aislamiento y purificación de dicha proteína de fusión dimérica.
37. Método según la reivindicación 35 ó 36, en el que dicho producto se selecciona entre enzimas, inhibidores enzimáticos, hormonas, moléculas implicadas en la adhesión

y/o señalización celular y compuesta por dominios, antígenos inmunogénicos, agentes terapéuticos, y moléculas inmunoreguladoras.

38. Método según la reivindicación 37, en el que dicho producto de interés se selecciona entre antígenos específicos de tumor, antígenos de enfermedades auto-inmune, factores de crecimiento, citoquinas, interleuquinas, interferones y minianticuerpos.

39. Una proteína de fusión dimérica obtenible por expresión de la secuencia de ácido nucleico contenida en una construcción de ADN según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 27.

40. Proteína de fusión dimérica según la reivindicación 37, que comprende:

- (i) la secuencia de aminoácidos de la α -hemolisina (HlyA) de *Escherichia coli* o de un fragmento de dicha proteína que comprende la señal de reconocimiento del mecanismo de secreción del sistema transportador de hemolisina (Hly) de *E. coli*;
- (ii) una secuencia de aminoácidos correspondiente a un dominio de dimerización; y
- (iii) la secuencia de aminoácidos de un producto de interés.

41. Proteína de fusión según la reivindicación 40, que comprende:

- (i) la secuencia completa de aminoácidos de HlyA de *E. coli*, o un fragmento de HlyA de *E. coli* que comprende la señal de reconocimiento del mecanismo de secreción del sistema transportador de Hly de *E. coli*;
- (ii) un dominio de dimerización, seleccionado entre una hélice peptídica y una estructura de doble arrollamiento helicoidal (coiled coil); y
- (iii) un producto de interés seleccionado entre una enzima, un inhibidor enzimático, una hormona, una molécula implicada en la adhesión y/o señalización celular y compuesta por dominios, un antígeno inmunogénico, un agente terapéutico, una molécula inmunoreguladora, y un minianticuerpo.

42. Proteína de fusión según la reivindicación 40 ó 41, que comprende, además (a) un péptido espaciador entre el producto de interés y el dominio de dimerización; y/o (b) un péptido para facilitar el aislamiento o purificación del péptido o proteína de fusión; y/o (c) un péptido que permita el reconocimiento del péptido o proteína de fusión; y/o (d)
- 5 una secuencia de aminoácidos susceptible de ser escindida específicamente por medios enzimáticos o químicos.
43. Proteína de fusión según la reivindicación 42, que comprende, (a) un péptido que contiene repeticiones de Gly-Gly-Gly-Ser o la región bisagra de un anticuerpo; y/o (b)
- 10 una secuencia de polihistidina o una secuencia peptídica reconocida por un anticuerpo monoclonal y que puede servir para purificar la proteína de fusión resultante por cromatografía de inmunoafinidad; y/o (c) una secuencia peptídica reconocida por un anticuerpo monoclonal y que puede servir para reconocer la proteína de fusión resultante por cromatografía de inmunoafinidad; y/o (d) una de aminoácidos que
- 15 constituye un sitio de reconocimiento de una enteroquinasa, Arg-C endoproteasa, Glu-C endoproteasa, Lys-C endoproteasa o Factor de coagulación Xa o una secuencia de aminoácidos susceptible de ser específicamente escindida por un reactivo químico.

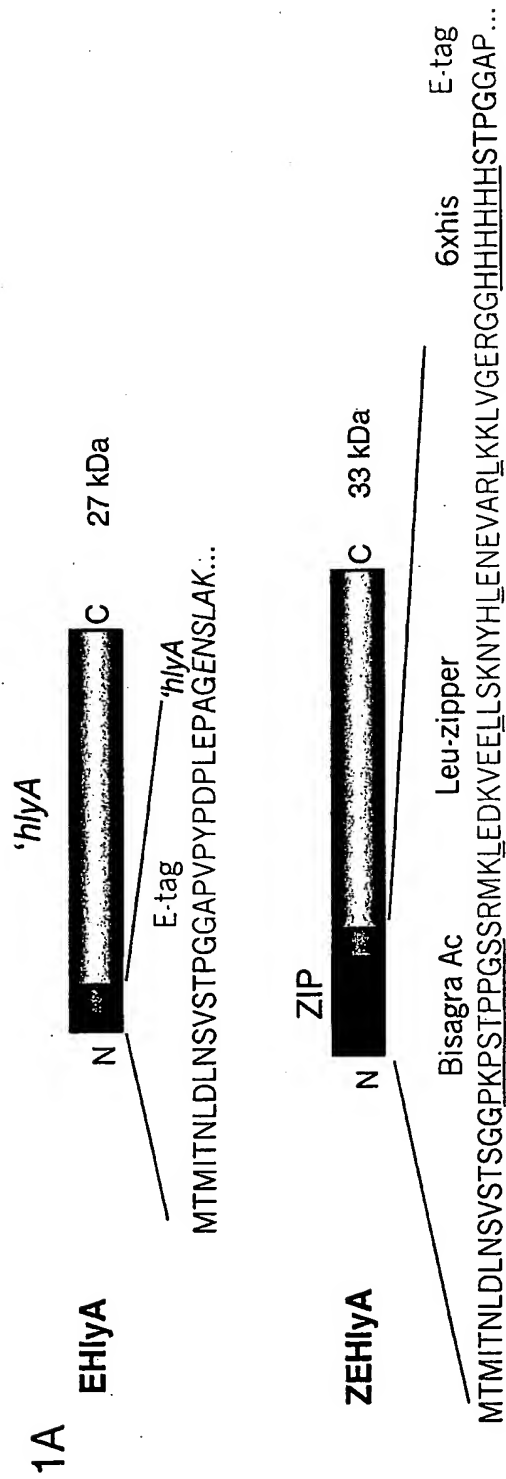


Fig. 1 (cont.)

W390 0003 1 18

1B

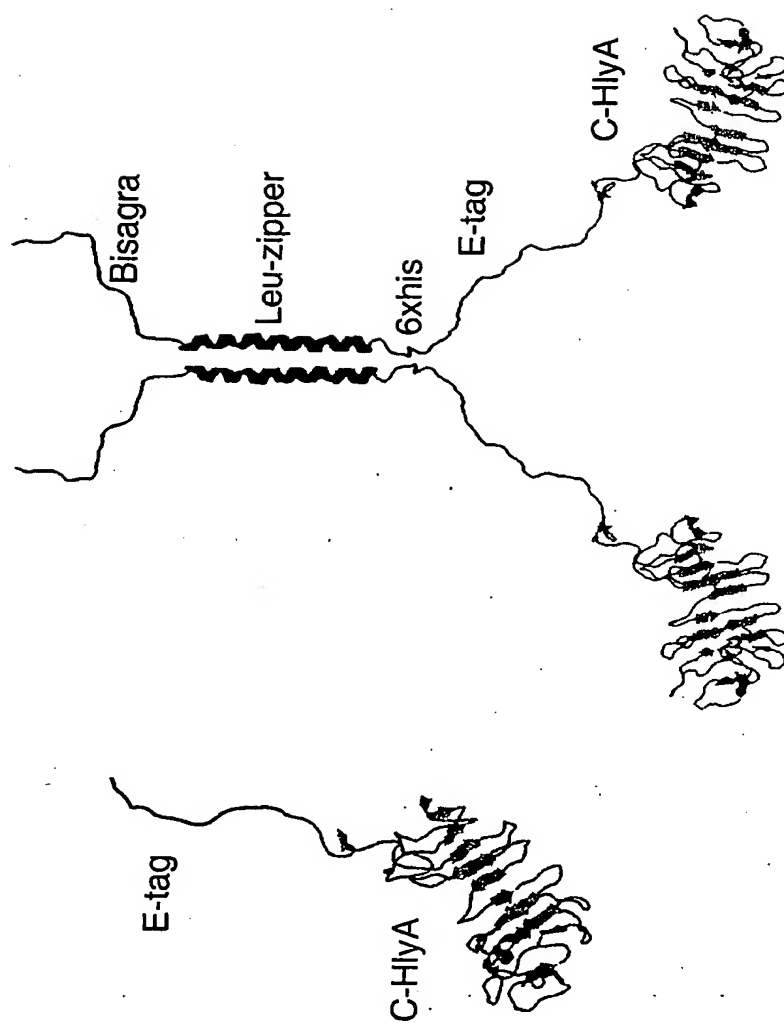


Fig. 1 (cont.)

N4390 0005 1 12

1C

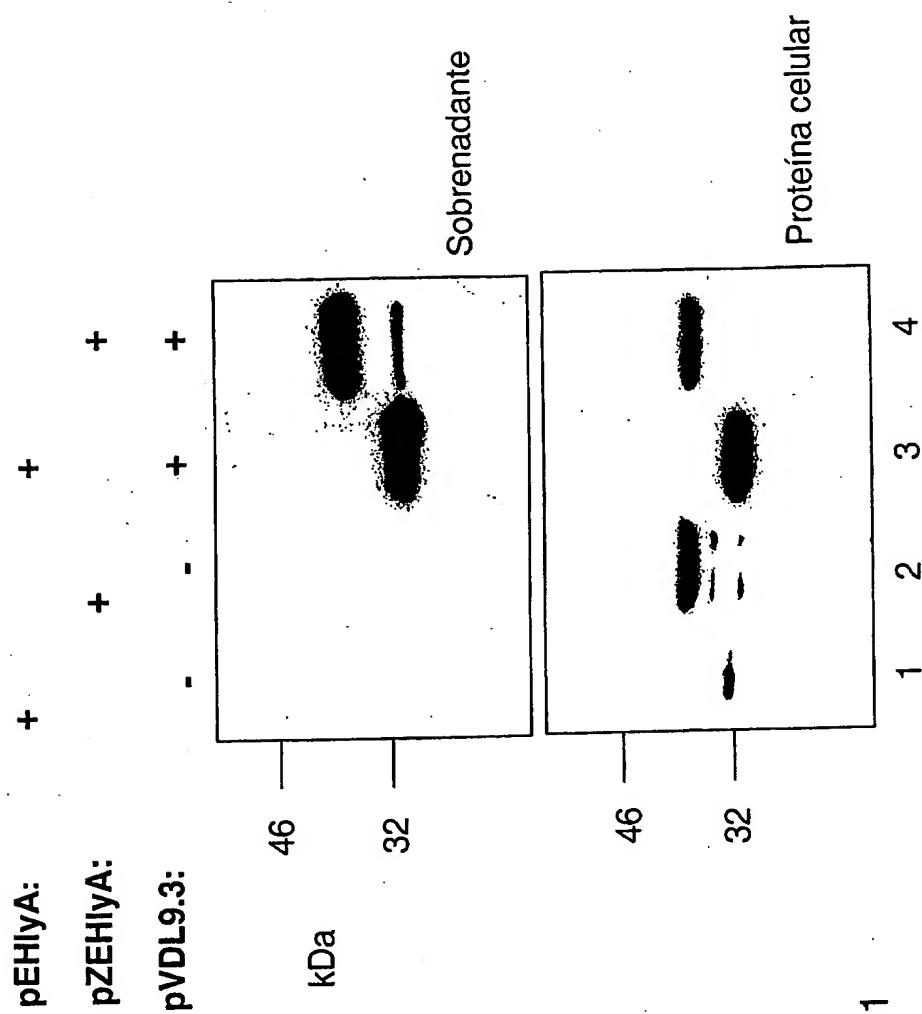


Fig. 1

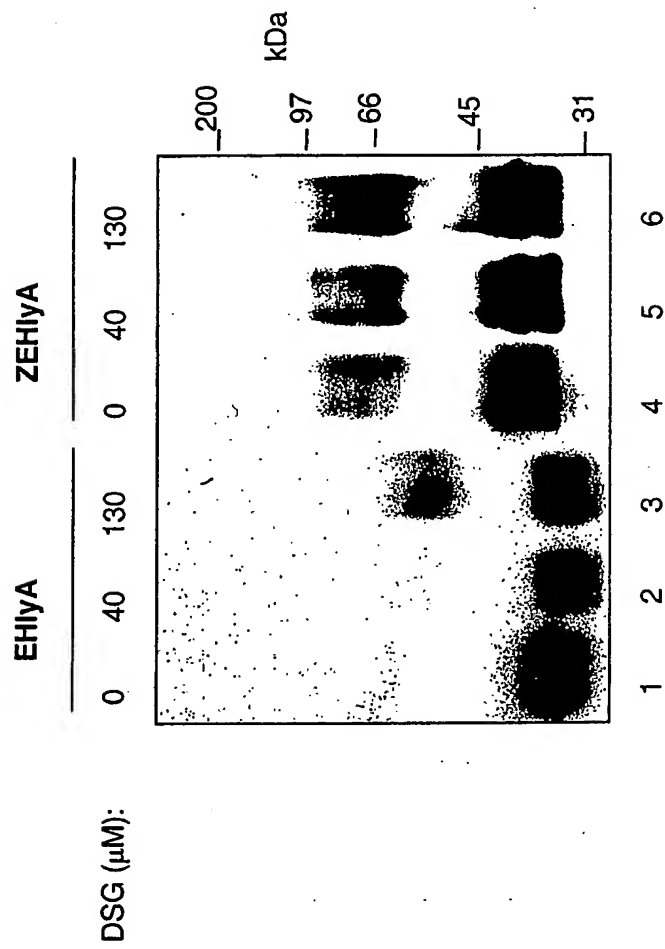


Fig. 2

M499 0003 1 10

3A

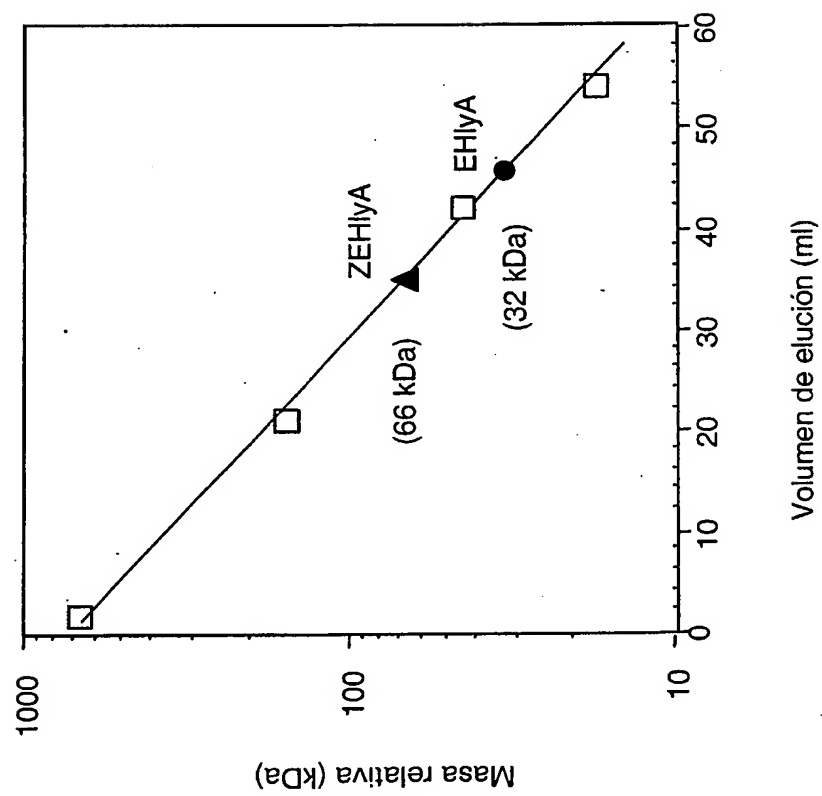
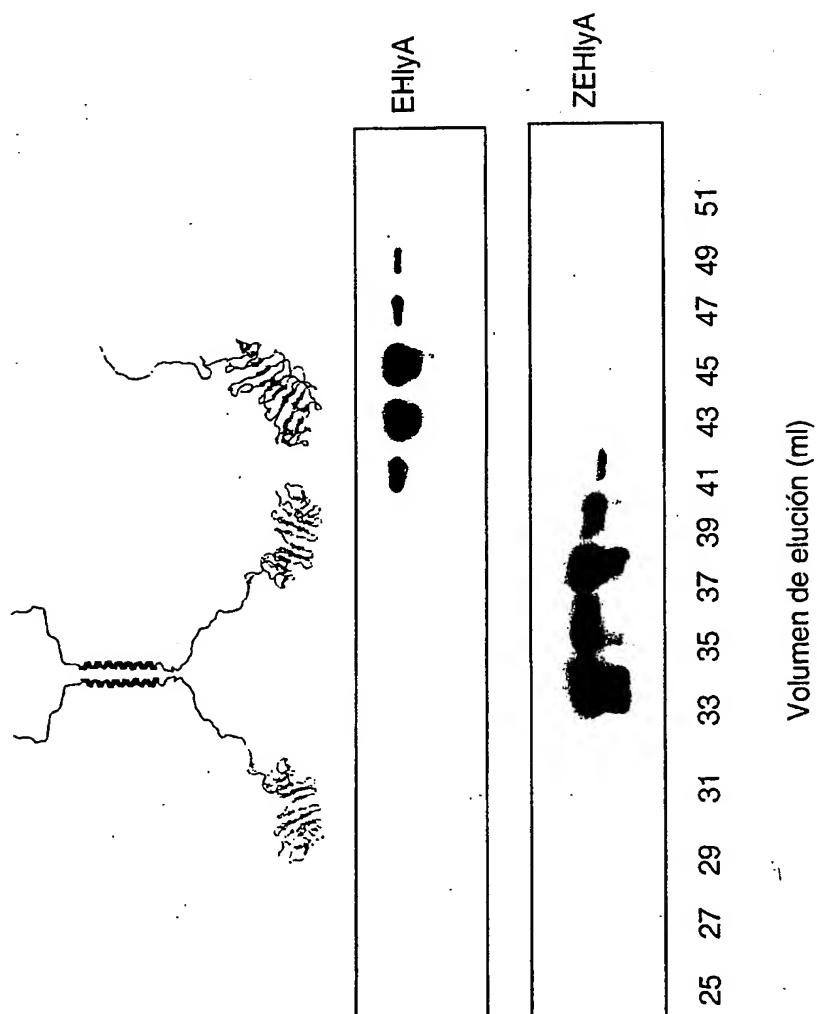


Fig. 3 (cont.)

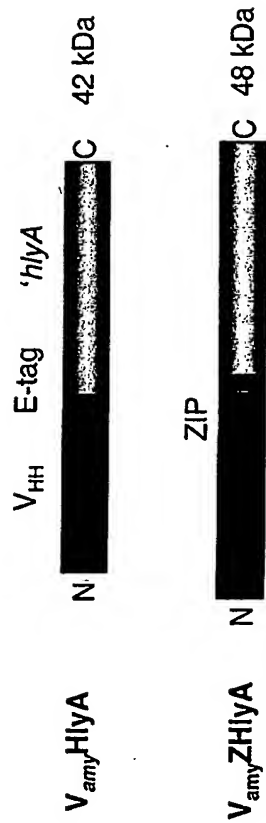
3B

Fig. 3



4400 0003 1 10

4A



4B

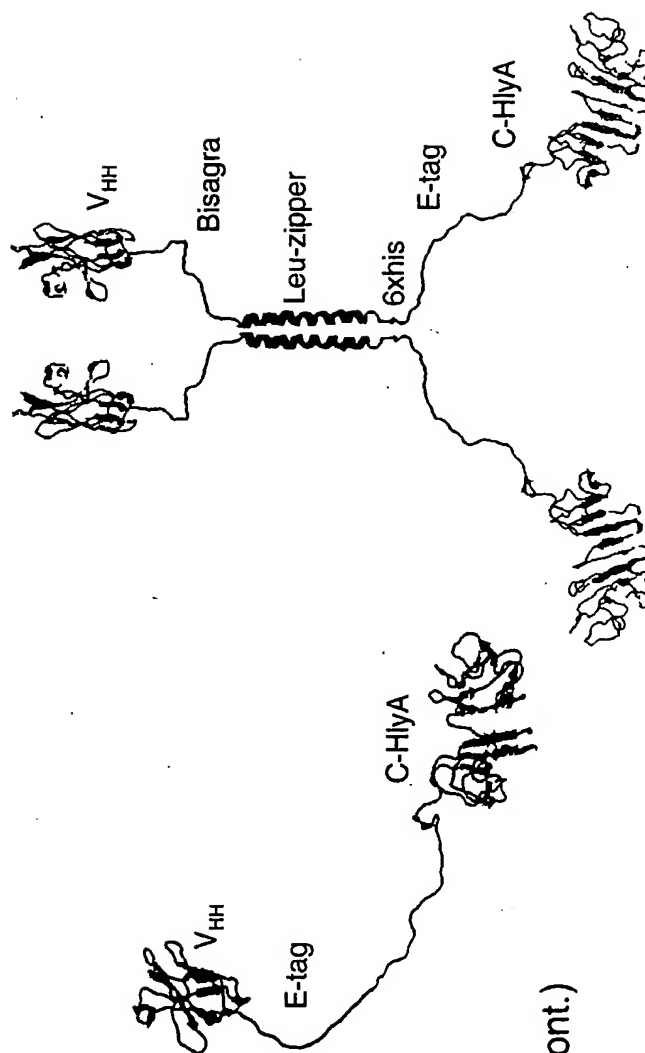
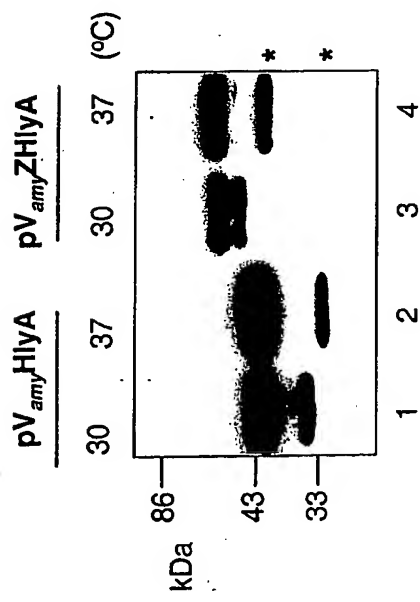


Fig. 4 (cont.)

W490 C003 1 10

4C



4D

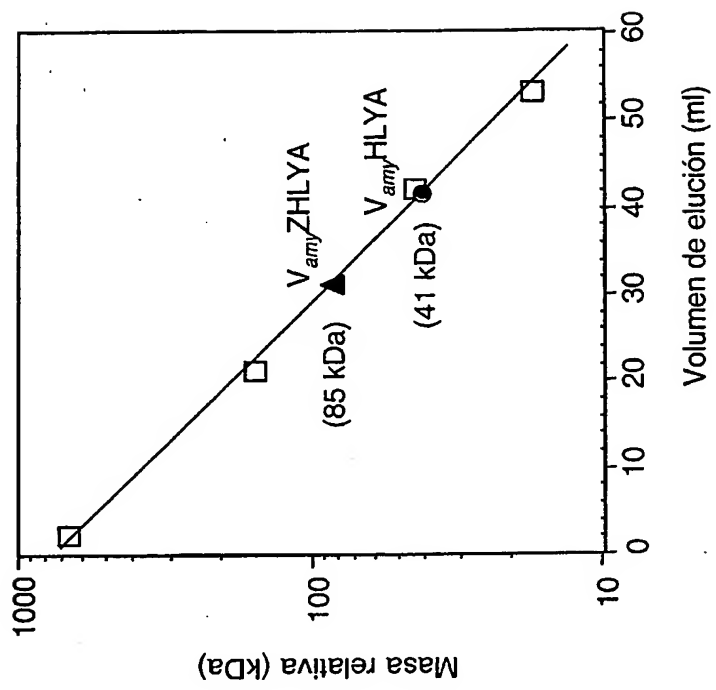
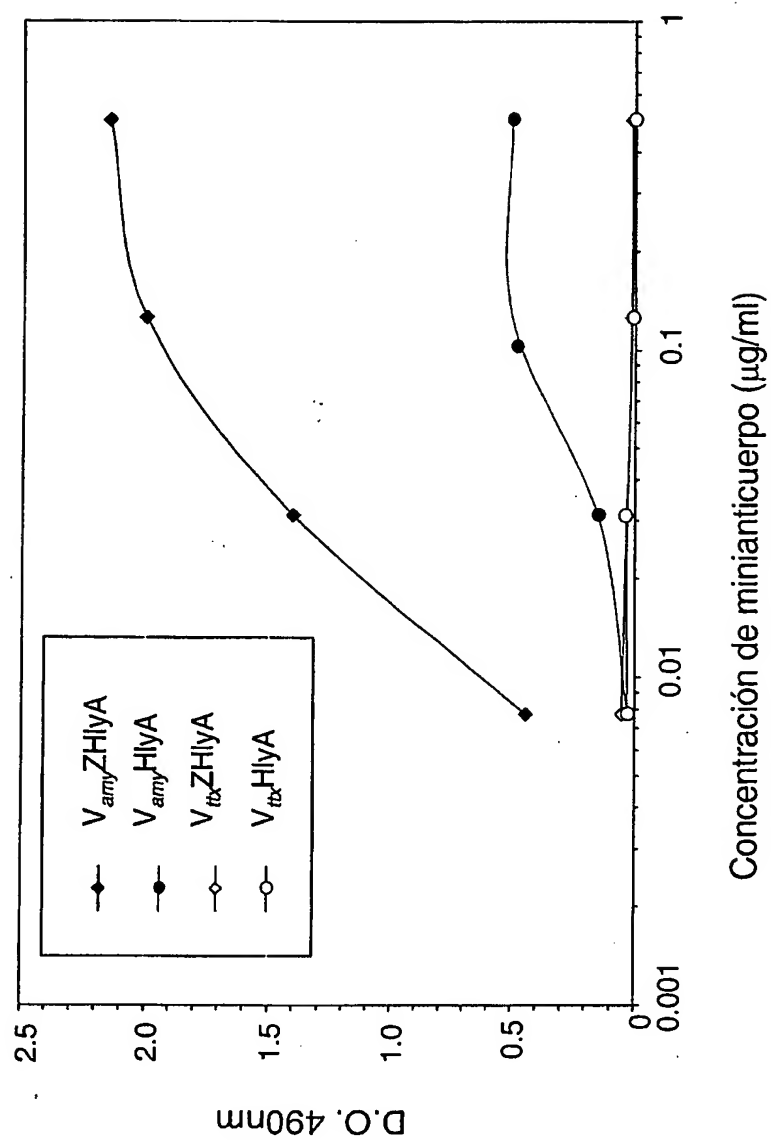


Fig. 4

Fig. 5



AGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCT (secuencia anterior a ATG)

Fig. 6 (cont.)

```

GGTAATGACAAGTTGTACGGCAGTGAGGGAGCAGACCTGCTTGATGGCGGAGAAGGGAAT
301 -----+-----+-----+-----+-----+ 360
CCATTACTGTTCAACATGCCGTCACCTCCCTCGTCTGGACGAACTACCGCCTCTTCCCTTA

a   G N D K L Y G S E G A D L L D G G E G N -

GATCTTCTGAAAGGTGGATATGGTAATGATATTTATCGTTATCTTTCAGGATATGGCCAT
361 -----+-----+-----+-----+-----+ 420
CTAGAAGACTTTCCACCTATAACCATTACTATAAATAGCAATAGAAAGTCCTATACCGGTA

a   D L L K G G Y G N D I Y R Y L S G Y G H -

CATATTATTGACGATGAAGGGGGGAAAGACGATAAACTCAGTTTAGCTGATATAGATTTTC
421 -----+-----+-----+-----+-----+ 480
GTATAATAACTGCTACTTCCCCCTTCTGCTATTTGAGTCAATCGACTATATCTAAAG

a   H I I D D E G G K D D K L S L A D I D F -

CGGGACGTTGCCTTTTAAGCGAGAAGGGAATGACCTCATTATGTATAAAGCTGAAGGTAAT
481 -----+-----+-----+-----+-----+ 540
GCCCTGCAACGGAAATTCGCTCTTCCCTTACTGGAGTAATACATATTTGACTTCCATTA

a   R D V A F K R E G N D L I M Y K A E G N -

GTTCTTTCTATTGGCCACAAAAATGGTATTACATTTAAAACTGGTTTGAAAAAGAGTCA
541 -----+-----+-----+-----+-----+ 600
CAAGAAAGATAACCGGTGTTTTTACCATAATGTAAATTTTGACCAAACCTTTTCTCAGT

a   V L S I G H K N G I T F K N W F E K E S -

GATGATCTCTCTAATCATCAGATAGAGCAGATTTTGGATAAAGACGGCAGGGTAATCACA
601 -----+-----+-----+-----+-----+ 660
CTACTAGAGAGATTAGTAGTCTATCTCGTCTAAAACTATTTCTGCCGTCCCATTAGTGT

a   D D L S N H Q I E Q I F D K D G R V I T -

CCAGATTCTCTTAAAAAAGCATTTTGAATATCAGCAGAGTAATAACAAGGTAAGTTATGTG
661 -----+-----+-----+-----+-----+ 720
GGTCTAAGAGAATTTTTTCGTAAACTTATAGTCGTCTCATTATTGTTCCATTCAATACAC

a   P D S L K K A F E Y Q Q S N N K V S Y V -

TATGGACATGATGCATCAACTTATGGGAGCCAGGACAATCTTAATCCATTAATTAATGAA
721 -----+-----+-----+-----+-----+ 780
ATACCTGTACTACGTAGTTGAATACCCTCGGTCCTGTTAGAATTAGGTAATTAATTAATT

a   Y G H D A S T Y G S Q D N L N P L I N E -

```

Fig. 6 (cont.)

NdeI

|

841 TCTTTATTGCAGTTGTCCGGTAATGCCAGTGATTTTTTCATATGGACGGA ACTCAATAACT
-----+-----+-----+-----+-----+ 900
AGAAATAACGTCAACAGGCCATTACGGTCACTAAAAAGTATACCTGCCTTGAGTTATTGA

a S L L Q L S G N A S D F S Y G R N S I T -

T T G A C A G C A T C A G C A T A A
 901 -----+----- 918
 A A C T G T C G T A G T C G T A T T
 a L T A S A * -

AccI BamHI EcoRI HindIII NdeI PstI SacI SalI
SmaI XbaI

KpnI NcoI NheI NotI SacII SphI

Fig. 6

Con 11 enzimas: ECORI BGLII BAMHI NCOI NHEI SFII SALI XMAI XBAI EAGI SALI
HINDIII

$$1 = \gamma$$

Fig. 7 (cont.)

b H H H H H A S T P G G A P V P Y P D P L -
 6xhis tag |=> E-tag
 EagI
 |
 361 GGAACCGGCCGGGGGAAAATTCTCTTGCTAAAAATGTATTATCCGGTGGAAGGTAATGA
 -----+-----+-----+-----+-----+ 420
 CCTTGCGCCGGCCCCCTTTTAAGAGAACGATTTTACATAATAGGCCACCTTTTCCATTACT

b E P A G E N S L A K N V L S G G K G N D -
 |=> C-hlyA
 421 CAAGTTGTACGGCAGTGAGGGAGCAGACCTGCTTGATGGCGGAGAAGGGAATGATCTTCT
 -----+-----+-----+-----+-----+ 480
 GTTCAACATGCCGTCACTCCCTCGTCTGGACGAACTACCGCCTCTTCCCTTACTAGAAGA

b K L Y G S E G A D L L D G G E G N D L L -
 481 GAAAGGTGGATATGGTAATGATATTTATCGTTATCTTTCAGGATATGGCCATCATATTAT
 -----+-----+-----+-----+-----+ 540
 CTTTCACCTATACCATTACTATAAATAGCAATAGAAAGTCCTATACCGGTAGTATAATA

b K G G Y G N D I Y R Y L S G Y G H H I I -
 541 TGACGATGAAGGGGGGAAAGACGATAAACTCAGTTTAGCTGATATAGATTTCGGGACGT
 -----+-----+-----+-----+-----+ 600
 ACTGCTACTTCCCCCTTTCTGCTATTTGAGTCAAATCGACTATATCTAAAGGCCCTGCA

b D D E G G K D D K L S L A D I D F R D V -
 601 TGCCTTTAAGCGAGAAGGGAATGACCTCATTATGTATAAAGCTGAAGGTAATGTTCTTTC
 -----+-----+-----+-----+-----+ 660
 ACGGAAATTCGCTCTTCCCTTACTGGAGTAATACATATTTGACTTCCATTACAAGAAAG

b A F K R E G N D L I M Y K A E G N V L S -
 661 TATTGGCCACAAAAATGGTATTACATTTAAAAACTGGTTTGAAAAAGAGTCAGATGATCT
 -----+-----+-----+-----+-----+ 720
 ATAACCGGTGTTTTTACCATAATGTAAATTTTGACCAAACCTTTTCTCAGTCTACTAGA

b I G H K N G I T F K N W F E K E S D D L -
 721 CTCTAATCATCAGATAGAGCAGATTTTGGATAAAGACGGCAGGGTAATCACACCAGATTCT
 -----+-----+-----+-----+-----+ 780
 GAGATTAGTAGTCTATCTCGTCTAAAAACTATTTCTGCCGTCCCATTAGTGTGGTCTAAG

b S N H Q I E Q I F D K D G R V I T P D S -
 781 TCTTAAAAAGCATTGGAATATCAGCAGAGTAATAACAAGGTAAGTTATGTGTATGGACA
 -----+-----+-----+-----+-----+ 840
 AGAATTTTTTCGTAAACTTATAGTCGTCTCATTATGTTCCATTCAATACACATACCTGT

Fig. 7 (cont.)




















Fig. 7 (cont.)

1381 ACAGATATCTTATTTCTGATCTGGAGCAGCGAAATCCCCGTGTTCTCGAACAGTCTGAGT
 -----+-----+-----+-----+-----+ 1440
 TGTCTATAGAATAAAGACTAGACCTCGTCGCTTTAGGGGCACAAGAGCTTGTCTCAGACTCA

 1441 TTGAGGCGTTATATCAGGGGCATATTATTCTTATCGCTTCCCGTTCTTCTGTTGCCGGGA
 -----+-----+-----+-----+-----+ 1500
 AACTCCGCAATATAGTCCCCGTATAATAAGAATAGCGAAGGGCAAGAAGACAACGGCCCT

 1501 AACTGGCGAAATTTGACTTTACCTGGTTTATTCTGCTGCTTATAAAAATACAGGAGAATAT
 -----+-----+-----+-----+-----+ 1560
 TTGACCGCTTTAAACTGAAATGGACCAAATAAGGACGGTAATATTTATGTCCTCTTATA

 1561 TTATTGAAACCCTTGTTGTGTCTGTTTTTTTACAATTATTTGCATTAATAACCCCCCTTT
 -----+-----+-----+-----+-----+ 1620
 AATAACTTTGGGAACAACACAGACAAAAAATGTTAATAAACGTAATTATTGGGGGGGAAA

 1621 TTTTTCAGGTGGTTATGGACAAAGTATTAGTGCACAGGGGATTTTCAACTCTTAATGTTA
 -----+-----+-----+-----+-----+ 1680
 AAAAAGTCCACCAATACCTGTTTCATAATCACGTGTCCCTAAAAGTTGAGAATTACAAT

 1681 TTACTGTGCGATTATCTGTTGTGGTGGTGGTTTGAGATTATACTCAGCGGTTTAAGAACTT
 -----+-----+-----+-----+-----+ 1740
 AATGACAGCGTAATAGACAACACCACCACAACTCTAATATGAGTCGCCAAATTCTTGAA

 1741 ACATTTTTCACATAGTACAAGTGGGATTGATGTTGAGTTGGGTGCCAAACTCTTCCGGC
 -----+-----+-----+-----+-----+ 1800
 TGTA AAAACGTGTATCATGTTTCAGCCTAACTACA ACTCAACCCACGGTTTGAGAAGGCCG

 1801 ATTTACTGGCGCTACCGATCTCTTATTTTGAGAGTCGTCGTGTTGGTGATACTGTTGCCA
 -----+-----+-----+-----+-----+ 1860
 TAAATGACCGCGATGGCTAGAGAATAAACTCTCAGCAGCACAACTACTATGACAACGGT

 1861 GGGTAAGAGAATTAGACCAGATCCGTAATTTTCTGACAGGACAGGCATTAACATCTGTTT
 -----+-----+-----+-----+-----+ 1920
 CCCATTCTCTTAATCTGGTCTAGGCATTAAAAGACTGTCCTGTCCTGTAATTGTAGACAAG

 HindIII
 |
 1921 TGGACTTATTATTTTCATTCATATTTTTTGCGGTAATGTGGTATTACAGTCCAAAGCTT
 -----+-----+-----+-----+-----+ 1979
 ACCTGAATAATAAAGTAAGTATAAAAAACGCCATTACACCATAATGTCAGGTTTCGAA

Fig. 7 (cont.)

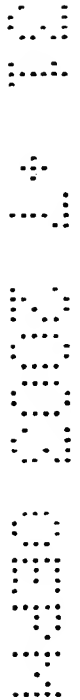
Enzimas que cortan:

BamHI	BglII	EagI	EcoRI	HindIII	NcoI	NheI	SalI
SfiI	XbaI	XmaI					

Enzimas que no cortan:

Ninguno

Fig. 7



Mapa de pVamyHLYA

Con 8 enzimas: NCOI PSTI SALI HINDIII SFII BAMHI NOTI ECORI PSTI

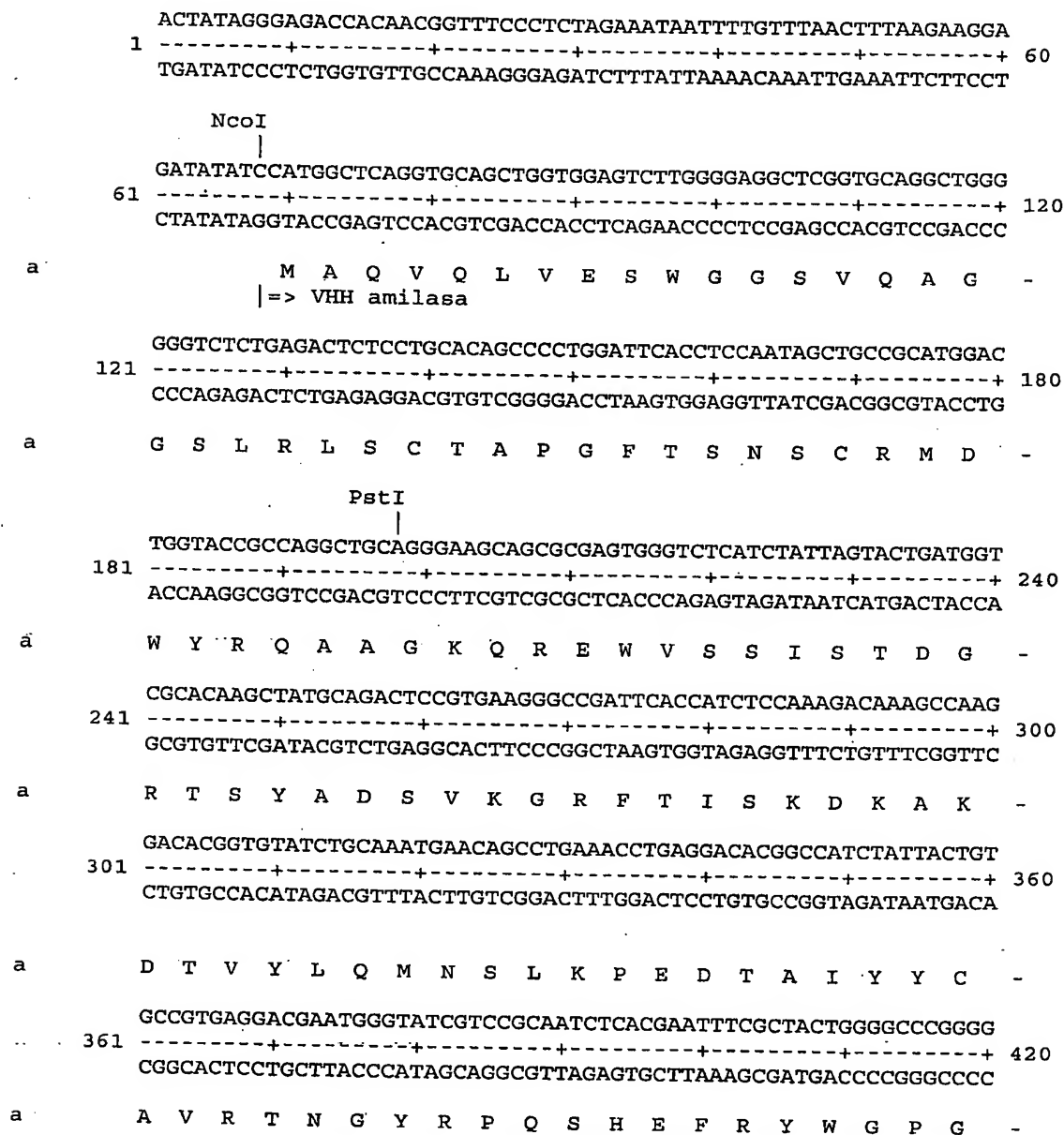


Fig. 8 (cont.)

Fig. 8 (cont.)

The figure shows five 5x5 dot patterns arranged horizontally. Each pattern is a 5x5 grid of dots with some dots missing to form a digit. The digits represented are 0, 1, 2, 3, and 4 from left to right.

```

a      R V I T P D S L K K A F E Y Q Q S N N K -
      GTAAGTTATGTGTATGGACATGATGCATCAACTTATGGGAGCCAGGACAATCTTAATCCA
961  -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1020
      CATTCAATACACATACCTGTACTACGTAGTTGAATACCCTCGGTCCTGTTAGAATTAGGT

a      V S Y V Y G H D A S T Y G S Q D N L N P -
                                PstI
                                |
      TTAATTAATGAAATCAGCAAAATCATTTCAGCTGCAGGTAACCTTCGATGTTAAGGAGGAA
1021 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1080
      AATTAATTACTTTAGTCGTTTTAGTAAAGTCGACGTCCATTGAAGCTACAATTCCTCCTT

a      L I N E I S K I I S A A G N F D V K E E -
      AGATCTGCCGCTTCTTTATTGCAGTTGTCCGGTAATGCCAGTGATTTTTCATATGGACGG
1081 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1140
      TCTAGACGGCGAAGAAATAACGTCAACAGGCCATTACGGTCACTAAAAAGTATACCTGCC

a      R S A A S L L Q L S G N A S D F S Y G R -
      AACTCAATAACTTTGACAGCATCAGCATAATATATTAATTTAAATGATAGCAATCTTACT
1141 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1200
      TTGAGTTATTGAAACTGTCGTAGTCGTATTATATAATTAAATTTACTATCGTTAGAATGA

a      N S I T L T A S A * -
      GGGCTGTGCCACATAAGATTGCTATTTTTTTGGAGTCATAATGGATTCTTGTCATAAAAT
1201 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1260
      CCCGACACGGTGTATTCTAACGATAAAAAAACCTCAGTATTACCTAAGAACAGTATTTTA

      TGATTATGGGTTATACGCCCTGGAGATTTTAGCCCAATACCATAACGTCTCTGTAAACCC
1261 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1320
      ACTAATACCCAATATGCGGGACCTCTAAAATCGGGTTATGGTATTGCAGAGACAATTGGG

      GGAAGAAATTAAACATAGATTTGACACAGACGGGACTGGTCTGGGATTAACGTCATGGTT
1321 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1380
      CCTTCTTTAATTTGTATCTAAACTGTGTCTGCCCTGACCAGACCCTAATTGCAGTACCAA

      GCTTGCTGCGAAATCTTTAGAACTAAAGGTAAAACAGGTAAAAAAAACAATTGACCGATT
1381 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1440
      CGAACGACGCTTTAGAAATCTTGATTTCCATTTTGTCCATTTTTTTTGTAACTGGCTAA

      AAACTTTATTTCTCTGCCCGCATTAGTCTGGAGAGAGGATGGACGTCATTTTATTCTGAC
1441 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1500
      TTTGAAATAAAGAGACGGGCGTAATCAGACCTCTCTCTACCTGCAGTAAAATAAGACTG

```

Fig. 8 (cont.)

```

TAAAGTCAGTAAAGAAGCAAACAGATATCTTATTTCTGATCTGGAGCAGCGAAATCCCCG
1501 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1560
ATTTTCAGTCATTTCTTCGTTTGTCTATAGAATAAAGACTAGACCTCGTCGCTTTAGGGGC

TGTTCCTCGAACAGTCTGAGTTTGAGGCGTTATATCAGGGGCATATTATTCTTATCGCTTC
1561 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1620
ACAAGAGCTTGTCTCAGACTCAAACCTCCGCAATATAGTCCCCGTATAATAAGAATAGCGAAG

CCGTTCTTCTGTTGCCGGGAAACTGGCGAAATTTGACTTTACCTGGTTTATTCTGCCAT
1621 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1680
GGCAAGAAGACAACGGCCCTTTGACCGCTTTAAACTGAAATGGACCAAATAAGGACGGTA

TATAAAATACAGGAGAATATTTATTGAAACCCTTGTTGTGTCTGTTTTTTTACAATTATT
1681 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1740
ATATTTTATGTCTCTTATAAATAACTTTGGGAACAACACAGACAAAAAATGTTAATAA

TGCATTAATAACCCCCCTTTTTTTTCAGGTGGTTATGGACAAAGTATTAGTGCACAGGGG
1741 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1800
ACGTAATTATTGGGGGGAAAAAAGTCCACCAATACCTGTTTCATAATCACGTGTCCCC

ATTTTCAACTCTTAATGTTATTACTGTGCGCATTATCTGTTGTGGTGGTGTGTTGAGATTAT
1801 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1860
TAAAAGTTGAGAATTACAATAATGACAGCGTAATAGACAACACCACCACAACTCTAATA

ACTCAGCGGTTTAAGAACTTACATTTTTGCACATAGTACAAGTCGGATTGATGTTGAGTT
1861 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1920
TGAGTCGCCAAATTCCTGAATGTAAAAACGTGTATCATGTTACGCCCTAACTACAACCTCAA

GGGTGCCAAACTCTTCCGGCATTACTGGCGCTACCGATCTCTTATTTTGAGAGTCGTGCG
1921 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1980
CCCACGGTTTGAGAAGGCCGTAAATGACCGCGATGGCTAGAGAATAAACTCTCAGCAGC

TGTGTTGGTGATACTGTTGCCAGGGTAAGAGAATTAGACCAGATCCGTAATTTTCTGACAGG
1981 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2040
ACAACCACTATGACAACGGTCCCATTCTCTTAATCTGGTCTAGGCATTAAAGACTGTCC

ACAGGCATTAAACATCTGTTCTGGACTTATTATTTTCATTCATATTTTTTGCGGTAATGTG
2041 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2100
TGTCGGTAATTGTAGACAAGACCTGAATAATAAAAGTAAGTATAAAAAACGCCATTACAC

```

Fig. 8 (cont.)

HindIII
|

2101 GTATTACAGTCCAAAGCTTACTCTGGTGATCTTATTTTCGCTGCCTTGTTATGCTGCATG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2160
CATAATGTCAGGTTTCGAATGAGACCACCTAGAATAAAAGCGACGGAACAATACGACGTAC

2161 GTCTGTTTTTTATTAGCCCCATTTTGGCAGCTCGCCTTGATGATAAGTTTTACGGAATGC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2220
CAGACAAAATAATCGGGGTAAACGCTGCAGCGGAACACTACTATTCAAAAGTGCCTTACG

2221 GGATAATCAATCTTTCCTGGTGGAATCAGTCACGGCGATTAACACTATAAAAGCTATGGC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2280
CCTATTAGTTAGAAAGGACCACCTTAGTCAGTGCCGCTAATTGTGATATTTTCGATACCG

PstI
|

2281 AGTCTCACCTCAGATGACGAACATATGGGACAAACAATTGGCAGGATATGTTGCTGCAGG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2340
TCAGAGTGGAGTCTACTGCTTGTATACCCTGTTTGTTAACCGTCCTATACAACGACGTCC

2341 CTTCAAAGTGACAGTATTAGCAAGCATTGGTCAACAAGGAATACAGTTAATACAAAAGAC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2400
GAAGTTTCACTGTCATAATCGTTGGTAACCAGTTGTTCTTATGTCAATTATGTTTTCTG

2401 TGTATGATCATCAACCTGTGGTTGGGAGCACACCTGGTTATTTCCGGGGATTAAAGTAT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2460
ACAATACTAGTAGTTGGACACCAACCCTCGTGTGGACCAATAAAGGCCCCCTAAATTCATA

2461 TGGTCAGTTAATTGCTTTTAATATGCTTGCTGGTCAGATTGTTGCACCGGTTATTTCGCCT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2520
ACCAGTCAATTAACGAAAATTATACGAACGACCAGTCTAACAACGTGGCCAATAAGCGGA

2521 TGCACAAATCTGGCAGGATTTCCAGCAGGTTGGTATATCAGTTACCCGCCCTTGGTGATGT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2580
ACGTGTTTAGACCGTCCTAAAGGTCGTCCAACCATATAGTCAATGGGCGGAACCACTACA

2581 GCTTAACTCTCCAAGTAAAGTTATCATGGGAACTGGCATTACCGGAAATTAATGGTGA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2640
CGAATTGAGAGGTTGACTTTCAATAGTACCCCTTGACCGTAATGGCCTTTAATTACCACT

2641 TATCACTTTTCGTAATATCCGGTTTCGCTATAAGCCTGACTCTCCGGTTATTTTAGATAA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2700
ATAGTGAAAAGCATTATAGGCCAAAGCGATATTCGGACTGAGAGGCCAATAAAATCTATT

2701 TATCAATCTCAGTATTAAGCAGGGGGAGGTTATTGGTATTGTCGGACGTTCTGGTTCAGG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2760
ATAGTTAGAGTCATAATTCGTCCCCCTCCAATAACCATAACAGCCTGCAAGACCAAGTCC

Fig. 8 (cont.)

61

AAAAAGCACATTAAGTAAATTAATTCAACGTT
2761 -----+-----+-----+----- 2792
TTTTTCGTGTAATTGATTTAATTAAGTTGCAA

Enzimas que cortan:

BamHI HindIII NcoI PstI Sali SfiI

Enzimas que no cortan:

EcoRI NotI

Fig. 8

61
2761
2792
TTTTTCGTGTAATTGATTTAATTAAGTTGCAA

Mapa de pVamyZHL_{YA}

Con 11 enzimas: ECORI SPHI PSTI NCOI NHEI NDEI BAMHI HINDIII
SALI SFII NOTI

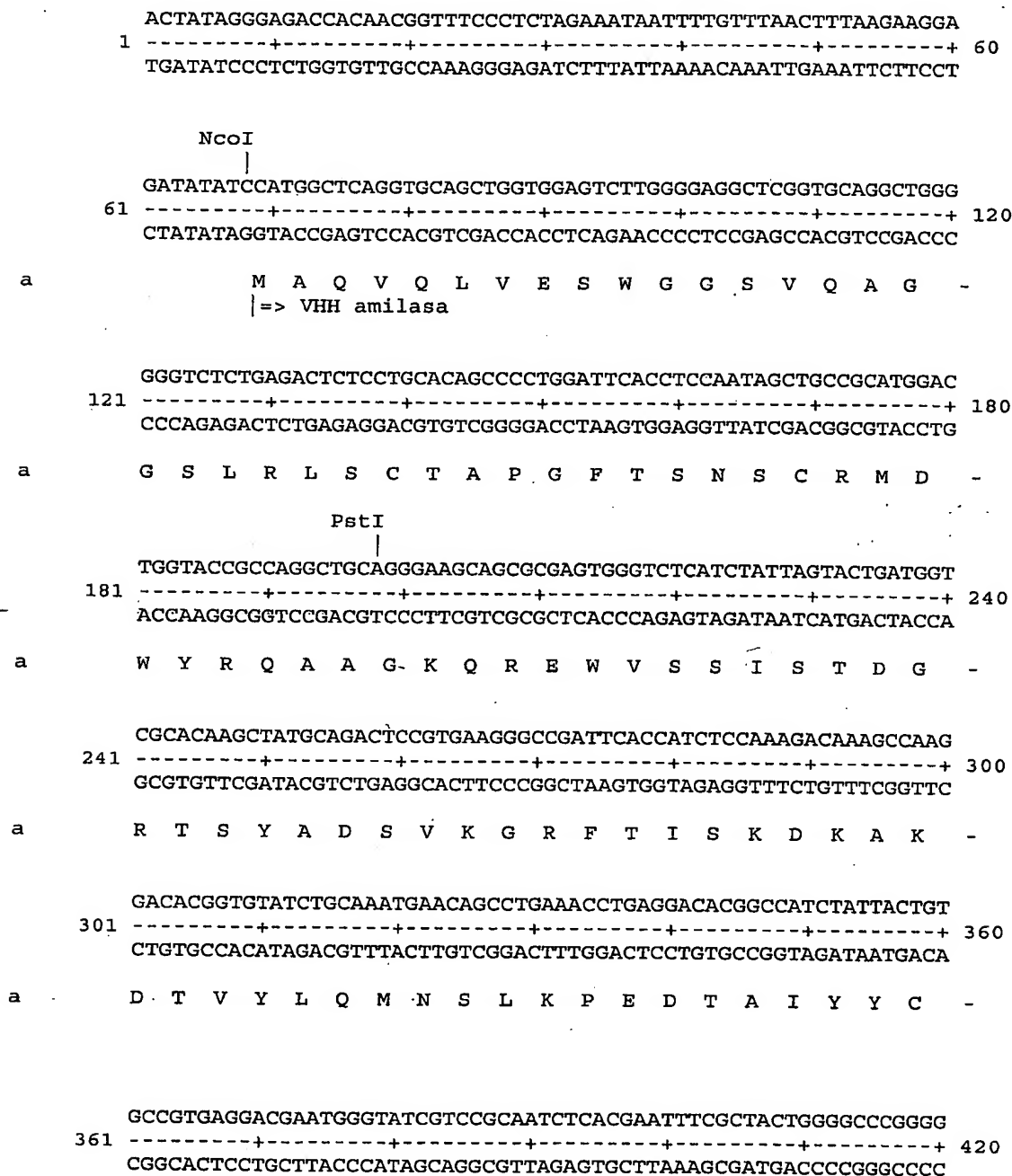


Fig. 9 (cont.)

```

a   A V R T N G Y R P Q S H E F R Y W G P G -

                                     SfiI   SalI
                                     |     |
421 ACCCAGGTCACCGTCTCCTCAACGGCCTCGGGGGCCGCGTCGACGTCCGGCGGTCCGAAG
    -----+-----+-----+-----+-----+ 480
    TGGGTCCAGTGGCAGAGGAGTTGCCGGAGCCCCCGGCGCAGCTGCAGGCCGCCAGGCTTC

a   T Q V T V S S T A S G A A S T S G G P K -
                                     |=> Ig hinge

    CTTTCCACTCCGCCCCGGGTCTTCCCGTATGAAACAGCTGGAAGACAAAGTAGAgGAGCTC
481 -----+-----+-----+-----+-----+ 540
    GGAAGGTGAGGCGGGCCCAAGGGCATACTTTGTGACCTTCTGTTTCATCTTCTCGAG

a   P S T P P G S S R M K Q L E D K V E E L -
                                     |=> Leucine Zipper GCN4

                                     HindIII
                                     |
541 CTTAGCAAGAACTACCATCTAGAAAACGAGGTAGCTCGTCTGAAAAAGCTTGTGGTGAA
    -----+-----+-----+-----+-----+ 600
    GAATCGTTCCTTGATGGTAGATCTTTTGCTCCATCGAGCAGACTTTTTCGAACAACCACTT

a   L S K N Y H L E N E V A R L K K L V G E -

                                     SalI
                                     |
601 CGTGGTGGTCACCATCACCATCACCATGCGTCGACGCCCCGGGGTGCGCCGGTGCCGTAT
    -----+-----+-----+-----+-----+ 660
    GCACCACCAGTGGTAGTGGTAGGTACGCAGCTGCGGGCCCCCACGCGGCCACGGCATA

a   R G G H H H H H A S T P G G A P V P Y -
    |=> 6xhis tag                                     |=> E-tag

BamHI
|
661 CCGGATCCGCTGGAACCGGCCGGGgAAAATtCTCTTGCTAAAAATGTATTATCCGGTGGA
    -----+-----+-----+-----+-----+ 720
    GGCCTAGGCGACCTTGGCCGGCCCCcTTTAAgAGAAACGATTTTACATAATAGGCCACCT

a   P D P L E P A G E N S L A K N V L S G G -
                                     |=> C-hlyA

    AAAGGTAATGACAAGTTGTACGGCAGTGAGGGAGCAGACCTGCTTGATGGCGGAGAAGGG
721 -----+-----+-----+-----+-----+ 780
    TTTCCATTACTGTTCAACATGCCGTCACTCCCTCGTCTGGACGAACCTACCGCCTCTTCCC

a   K G N D K L Y G S E G A D L L D G G E G -

```

Fig. 9 (cont.)

```

      AATGATCTTCTGAAAGGTGGATATGGTAATGATATTTATCGTTATCTTTTCAGGATATGGC
781  -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 840
      TTACTAGAAGACTTTCCACCTATACCATTACTATAAATAGCAATAGAAAGTCCTATACCG

a      N D L L K G G Y G N D I Y R Y L S G Y G -

      CATCATATTATTGACGATGAAGGGGGGAAAGACGATAAACTCAGTTTAGCTGATATAGAT
841  -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 900
      GTAGTATAATAACTGCTACTTCCCCCCTTTCTGCTATTTGAGTCAAATCGACTATATCTA

a      H H I I D D E G G K D D K L S L A D I D -

      TTCCGGGACGTTGCCTTTAAGCGAGAAGGGAATGACCTCATTATGTATAAAGCTGAAGGT
901  -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 960
      AAGGCCCTGCAACGGAAATTCGCTCTTCCCTTACTGGAGTAATACATATTTGCACTTCCA

a      F R D V A F K R E G N D L I M Y K A E G -

      AATGTTCTTTCTATTGGCCACAAAATGGTATTACATTTAAAAACTGGTTTGAAAAAGAG
961  -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1020
      TTACAAGAAAGATAACCGGTGTTTTTACCATAATGTAAATTTTTGACCAAACCTTTTTCTC

a      N V L S I G H K N G I T F K N W F E K E -

      TCAGATGATCTCTCTAATCATCAGATAGAGCAGATTTTTTGATAAAGACGGCAGGGTAATC
1021 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1080
      AGTCTACTAGAGAGATTAGTAGTCTATCTCGTCTAAAAACTATTTCTGCCGTCCCATTAG

a      S D D L S N H Q I E Q I F D K D G R V I -

      ACACCAGATTCTCTTAAAAAAGCATTGGAATATCAGCAGAGTAATAACAAGGTAAGTTAT
1081 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1140
      TGTGGTCTAAGAGAATTTTTTCGTAAACTTATAGTCGTCTCATTATTGTTCCATTCAATA

a      T P D S L K K A F E Y Q Q S N N K V S Y -

      GTGTATGGACATGATGCATCAACTTATGGGAGCCAGGACAATCTTAATCCATTAATTAAT
1141 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1200
      CACATACCTGTACTACGTAGTTGAATACCCTCGGTCCTGTTAGAATTAGGTAATTAATTA

a      V Y G H D A S T Y G S Q D N L N P L I N -

```

Fig. 9 (cont.)

PstI
|

1201 GAAATCAGCAAAATCATTTCAGCTGCAGGTAACCTCGATGTTAAGGAGGAAAGATCTGCC
-----+-----+-----+-----+-----+ 1260
CTTTAGTCGTTTTAGTAAAGTCGACGTCCATTGAAGCTACAATTCCTCCTTTCTAGACGG

a E I S K I I S A A G N F D V K E E R S A -

NdeI
|

1261 GCTTCTTTATTGCAGTTGTCCGGTAATGCCAGTGATTTTTCATATGGACGGAACCTCAATA
-----+-----+-----+-----+-----+ 1320
CGAAGAAATAACGTCAACAGGCCATTACGGTCACTAAAAAGTATACCTGCCTTGAGTTAT

a A S L L Q L S G N A S D F S Y G R N S I -

1321 ACTTTGACAGCATCAGCATAATATATTAATTTAAATGATAGCAATCTTACTGGGCTGTGC
-----+-----+-----+-----+-----+ 1380
TGAAACTGTCTAGTCGTATTATATAATTAAATTTACTATCGTTAGAATGACCCGACACG

a T L T A S A * -

1381 CACATAAGATTGCTATTTTTTTGGAGTCATAATGGATTCTTGTCTATAAAATTGATTATGG
-----+-----+-----+-----+-----+ 1440
GTGTATTCTAACGATAAAAAAACCTCAGTATTACCTAAGAACAGTATTTTAACTAATACC

1441 GTTATACGCCCTGGAGATTTTAGCCCAATACCATAACGTCTCTGTTAACCCGGAAGAAAT
-----+-----+-----+-----+-----+ 1500
CAATATGCGGGACCTCTAAATCGGGTTATGGTATTGCAGAGACAATTGGGCCTTCTTTA

1501 TAAACATAGATTTGACACAGACGGGACTGGTCTGGGATTAACGTCTATGGTTGCTTGCTGC
-----+-----+-----+-----+-----+ 1560
ATTTGTATCTAAACTGTGTCTGCCCTGACCAGACCCTAATTCAGTACCAACGAACGACG

1561 GAAATCTTTAGAACTAAAGGTAAAAACAGGTAAAAAAACAATTGACCGATTAACTTTAT
-----+-----+-----+-----+-----+ 1620
CTTTAGAAATCTTGATTTCATTTTGTCCATTTTTTTTGTAACTGGCTAATTTGAAATA

1621 TTCTCTGCCCCGATTAGTCTGGAGAGAGGATGGACGTCATTTTATCTGACTAAAGTCAG
-----+-----+-----+-----+-----+ 1680
AAGAGACGGGCGTAATCAGACCTCTCTCTACCTGCAGTAAATAAGACTGATTTCAGTC

1681 TAAAGAAGCAAACAGATATCTTATTTCTGATCTGGAGCAGCGAAATCCCCGTGTTCTCGA
-----+-----+-----+-----+-----+ 1740
ATTTCTTCGTTTGTCTATAGAATAAAGACTAGACCTCGTCGCTTTAGGGGCACAAGAGCT

Fig. 9 (cont.)

```

ACAGTCTGAGTTTGGAGCGTTATATCAGGGGCATATTATTCTTATCGCTTCCCGTTCTTC
1741 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1800
TGTCAGACTCAAACCTCCGCAATATAGTCCCCGTATAATAAGAATAGCGAAGGGCAAGAAG

TGTGCGCGGAAACTGGCGAAATTTGACTTTACCTGGGTTTATTCTGCCATTATAAAATA
1801 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1860
ACAACGGCCCTTTGACCGCTTTAAACTGAAATGGACCAAATAAGGACGGTAATATTTTAT

CAGGAGAATATTTATTGAAACCCTTGTGTGTCTGTTTTTTTACAATTATTTGCATTAAT
1861 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1920
GTCCTCTTATAAAATAACTTTGGGAACAACACAGACAAAAAATGTTAATAAACGTAATTA

AACCCCCCTTTTTTTTCAGGTGGTTATGGACAAAGTATTAGTGCACAGGGGATTTTCAAC
1921 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1980
TTGGGGGGAAAAAAAGTCCACCAATACCTGTTTCATAATCACGTGTCCCCTAAAAGTTG

TCTTAATGTTATTACTGTGCGATTATCTGTTGTGGTGGTGTGTTGAGATTATACTCAGCGG
1981 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2040
AGAATTACAATAATGACAGCGTAATAGACAACACCACCACAAACTCTAATATGAGTCGCG

TTAAGAAGCTTACATTTTGCACATAGTACAAGTCGGATTGATGTTGAGTTGGGTGCCAA
2041 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2100
AAATTCTTGAATGTAAAAACGTGTATCATGTTTCAGCCTAACTACAACCTCAACCCACGGTT

ACTCTTCCGGCATTACTGCGGCTACCGATCTCTTATTTTGGAGTTCGTCGTGTTGGTGA
2101 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2160
TGAGAAGGCCGTAAATGACCGCGATGGCTAGAGAATAAACTCTCAGCAGCACAACCACT

TACTGTTGCCAGGGTAAGAGAATTAGACCAGATCCGTAATTTTCTGACAGGACAGGCATT
2161 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2220
ATGACAACGGTCCCATTCTCTTAATCTGGTCTAGGCATTAAAAGACTGTCTGTCCGTAA

AACATCTGTTCTGGACTTATTATTTTCATTATTTTTCGCGTAATGTGGTATTACAG
2221 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2280
TTGTAGACAAGACCTGAATAATAAAAGTAAGTATAAAAAACGCCATTACACCATAATGTC

HindIII
|
TCCAAAGCTTACTCTGGTGATCTTATTTTCGCTGCCTTGTTATGCTGCATGGTCTGTTTT
2281 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2340
AGGTTTCTGAATGAGACCACTAGAATAAAAGCGACGGAACAATACGACGTACCAGACAAA

TATTAGCCCCATTTTGCAGCGTCGCCCTTGATGATAAGTTTTTCACGGAATGCGGATAATCA
2341 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2400
ATAATCGGGGTAAAACGCTGCAGCGGAACACTATTCAAAGTGCCTTACGCCTATTAGT

```

Fig. 9 (cont.)

```

ATCTTTCCTGGTGAATCAGTCACGGCGATTAACACTATAAAAGCTATGGCAGTCTCACC
2401 -----+-----+-----+-----+-----+ 2460
TAGAAAGGACCACCTTAGTCAGTGCCGCTAATTGTGATATTTTCGATACCGTCAGAGTGG

                NdeI                                PstI
                |                                    |
TCAGATGACGAACATATGGGACAAACAATTGGCAGGATATGTTGCTGCAGGCTTCAAAGT
2461 -----+-----+-----+-----+-----+ 2520
AGTCTACTGCTTGTATACCCTGTTTGTTAACCGTCCTATACAACGACGTCCGAAGTTTCA

GACAGTATTAGCAACCATTTGGTCAACAAGGAATACAGTTAATACAAAAGACTGTTATGAT
2521 -----+-----+-----+-----+-----+ 2580
CTGTCATAATCGTTGGTAACCAAGTTGTTTCTTATGTCAATTATGTTTTCTGACAACTACTA

CATCAACCTGTGGTTGGGAGCACACCTGGTTATTTCCGGGGATTTAAGTATTGGTCAGTT
2581 -----+-----+-----+-----+-----+ 2640
GTAGTTGGACACCAACCCTCGTGTGGACCAATAAAGGCCCTAAATTCATAACCAGTCAA

AATTGCTTTTAAATATGCTTGCTGGTCAGATTGTTGCACCGGTTATTCGCCTTGACACAAAT
2641 -----+-----+-----+-----+-----+ 2700
TTAACGAAAATTATACGAACGACCAGTCTAACAACGTGGCCAATAAGCGGAACGTGTTTA

CTGGCAGGATTTCCAGCAGGTTGGTATATCAGTTACCCGCCCTGGTGATGTGCTTAACTC
2701 -----+-----+-----+-----+-----+ 2760
GACCGTCCTAAAGGTCGTCCAACCATATAGTCAATGGGCGGAACCACTACACGAATTGAG

TCCAAGTAAAGTTATCATGGGAACTGGCATTACCGGAAATTAATGGTGATATCACTTT
2761 -----+-----+-----+-----+-----+ 2820
AGGTTGACTTTCAATAGTACCCTTTGACCGTAATGGCCTTTAATTACCACTATAGTGAAA

TCGTAATATCCGGTTTCGCTATAAGCCTGACTCTCCGGTTATTTTAGATAATATCAATCT
2821 -----+-----+-----+-----+-----+ 2880
AGCATTATAGGCCAAAGCGATATTCGGACTGAGAGGCCAATAAAATCTATTATAGTTAGA

CAGTATTAAGCAGGGGGAGGTTATTGGTATTGTCGGACGTTCTGGTTCAGGAAAAAGCAC
2881 -----+-----+-----+-----+-----+ 2940
GTCATAATTCGTCCCCCTCCAATAACCATAACAGCCTGCAAGACCAAGTCCTTTTTCGTG

ATTAAGTAAATTAATTCAACGTT
2941 -----+-----+-----+-----+ 2963
TAATTGATTTAATTAAGTTGCAA

```

Fig. 9 (cont.)

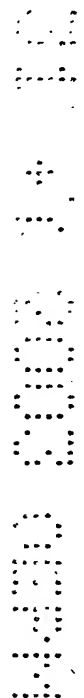
Enzimas que cortan:

BamHI	HindIII	NcoI	NdeI	PstI	SalI	SfiI
-------	---------	------	------	------	------	------

Enzimas que no cortan:

EcoRI	NheI	NotI	SphI
-------	------	------	------

Fig. 9



LISTA DE SECUENCIAS

<110> Consejo Superior de Investigaciones Científicas

- 5 <120> Sistema para la producción de proteínas diméricas basado en el sistema de transporte de hemolisina de *Escherichia coli*

<160> 8

- 10 <170> PatentIn version 2.0

<210> 1

<211> 654

<212> DNA

- 15 <213> *Escherichia coli*

<400> 1

```

ggaaaattct cttgctaaaa atgtattatc cgggtgaaaa ggtaatgaca agttgtacgg 60
cagtgaagga gcagacctgc ttgatggcgg agaagggaat gatcttctga aaggaggata 120
tggtaatgat atttatcggt atctttcagg atatggccat catattattg acgatgaagg 180
20 ggggaaagac gataaactca gtttagctga tatagatttc cgggacgttg cctttaagcg 240
agaagggaat gacctcatta tgtataaagc tgaaggtaat gttctttcta ttggccacaa 300
aaatggtatt acatttaaaa actggtttga aaaagagtca gatgatctct ctaatcatca 360
gatagagcag atttttgata aagacggcag ggtaatcaca ccagattctc ttaaaaaagc 420
atttgaatat cagcagagta ataacaagg aagttatgtg tatggacatg atgcatcaac 480
25 ttatgggagc caggacaatc ttaatccatt aattaatgaa atcagcaaaa tcatttcagc 540
tgcaggtaac ttcgatgtta aggaggaaag atctgccgct tctttattgc agttgtccgg 600
taatgccagt gatttttcat atggacggaa ctcaataact ttgacagcat cagc 654

```

<210> 2

- 30 <211> 218

<212> PRT

<213> *Escherichia coli*

<400> 2

```

Glu Asn Ser Leu Ala Lys Asn Val Leu Ser Gly Gly Lys Gly Asn Asp
35 1 5 10 15

Lys Leu Tyr Gly Ser Glu Gly Ala Asp Leu Leu Asp Gly Gly Glu Gly
20 25 30

40 Asn Asp Leu Leu Lys Gly Gly Tyr Gly Asn Asp Ile Tyr Arg Tyr Leu
35 40 45

Ser Gly Tyr Gly His His Ile Ile Asp Asp Glu Gly Gly Lys Asp Asp
50 55 60

45 Lys Leu Ser Leu Ala Asp Ile Asp Phe Arg Asp Val Ala Phe Lys Arg
65 70 75 80

50 Glu Gly Asn Asp Leu Ile Met Tyr Lys Ala Glu Gly Asn Val Leu Ser
85 90 95

Ile Gly His Lys Asn Gly Ile Thr Phe Lys Asn Trp Phe Glu Lys Glu
100 105 110

55 Ser Asp Asp Leu Ser Asn His Gln Ile Glu Gln Ile Phe Asp Lys Asp

```


115 120 125
 Gly Arg Val Ile Thr Pro Asp Ser Leu Lys Lys Ala Phe Glu Tyr Gln
 130 135 140
 5 Gln Ser Asn Asn Lys Val Ser Tyr Val Tyr Gly His Asp Ala Ser Thr
 145 150 155 160
 10 Tyr Gly Ser Gln Asp Asn Leu Asn Pro Leu Ile Asn Glu Ile Ser Lys
 165 170 175
 Ile Ile Ser Ala Ala Gly Asn Phe Asp Val Lys Glu Glu Arg Ser Ala
 180 185 190
 15 Ala Ser Leu Leu Gln Leu Ser Gly Asn Ala Ser Asp Phe Ser Tyr Gly
 195 200 205
 Arg Asn Ser Ile Thr Leu Thr Ala Ser Ala
 210 215
 20 <210> 3
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 25 <223> Región bisagra de anticuerpo
 <400> 1
 cggtcggaag ccttcactc cgcccggtc
 30
 <210> 4
 30 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Región bisagra de anticuerpo
 <400> 2
 Gly Pro Lys Pro Ser Thr Pro Pro Gly Ser
 35 1 5 10
 <210> 5
 <211> 33
 <212> DNA
 40 <213> Secuencia artificial
 <223> Oligonucleótido iniciador BACKHINGE
 <400> 5
 gcgtcgacgt ccggcggtcc gaagccttc act
 33
 45 <210> 6
 <211> 44
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <223> Oligonucleótido iniciador FORHIS
 50 <400> 6
 gcgtcgacgc atggtgatgg tgatggtgac cacc
 44

<210> 7

<211> 47

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

5 <223> Oligonucleótido iniciador VHHA1

<400> 7

ctatgcggcc cagccggcca tggctcaggt gcagctggtg gagtctt. 47

<210> 8

10 <211> 47

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<223> Oligonucleótido iniciador VHHA5fil

<400> 8

15 cgtcgacgcg gcccccgagg ccgttgagga gacggtgacc tgggtccc . 48